

In situ Bildgebung der AA-Amyloidose mithilfe
eines auf B10 basierenden VHH-Antikörpers

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biochemikerin Liesa Heinrich

geboren am 21.04.1988 in Erfurt

-
1. Gutachter Prof. Dr. Hans Peter Saluz, HKI Jena
 2. Gutachter Prof. Dr. Peter F. Zipfel, HKI Jena
 3. Gutachter Prof. Dr. Peter Neubauer, TU Berlin

Datum der Verteidigung: 23.10.2018

INHALT

Inhalt.....	2
1. Einleitung	1
1.1 Systemische Amyloidosen.....	1
1.1.1 Die AA-Amyloidose kann eine Folge chronischer Entzündungen sein	2
1.1.2 SAA ist das Vorläuferprotein des Protein AA.....	2
1.1.3 Amyloidfibrillen sind ein Bestandteil von Amyloidablagerungen im Gewebe.....	3
1.2 Mausmodelle der systemischen AA-Amyloidose	4
1.2.1 Induktion der AA-Amyloidose durch Inflammationsstimuli in Mäusen.....	4
1.2.2 Transgene Mausmodelle zur Untersuchung der AA-Amyloidose.....	5
1.3 Diagnostik der systemischen AA-Amyloidose.....	6
1.4 Therapie der systemischen AA-Amyloidose	8
1.5 <i>In situ</i> Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomografie	9
1.6 Rekombinante diagnostische Proteine und Antikörper	10
1.6.1 VHH sind die kleinsten funktionalen Antikörperformate	12
1.6.2 Herstellung von molekularen Bindern mithilfe von Protein Engineering	14
1.7 Die VHH-Domäne B10 erkennt ausgereifte Amyloidfibrillen.....	15
1.8 Zielstellung.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Plasmide und Zellen	20
2.1.3 Kulturmedien.....	20

2.1.4	Proteine, Enzyme und Antikörper	21
2.1.5	Kommerzielle Kits, gebrauchsfertige Lösungen, Standards.....	21
2.1.6	Chromatographiesäulen.....	22
2.1.7	Geräte und Material.....	22
2.1.8	Computerprogramme.....	24
2.1.9	Mäuse	24
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Gentechnische Herstellung der B10-Formate.....	24
2.2.2	Chemische Transformation	25
2.2.3	Kultivierung und Fermentation	25
2.2.4	Reinigung der B10-Formate.....	26
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.2.6	Western Blot.....	28
2.2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Gill und Hippel.....	29
2.2.8	LAL Test	29
2.2.9	Zytotoxizitätstest	30
2.2.10	Chloroform-Methanol Proteinfällung.....	30
2.2.11	Markierung der Antikörper mit Desferrioxamin	30
2.2.12	Test auf unspezifische Wechselwirkungen von B10AP im Hühnerei mittels PET/CT.	31
2.2.13	Immunogenität der Antikörper in Mäusen	31
2.2.14	ELISA zur Überprüfung der Immunogenität der Antikörper	32
2.2.15	Proteinstrukturvorhersage.....	32
2.2.16	Herstellung von A β (1-40)- und SAA-Amyloidfibrillen.....	32

2.2.17	Spot Blot.....	33
2.2.18	Biotinylierung von A β (1-40)-Fibrillen.....	33
2.2.19	Oberflächenplasmonresonanz.....	34
2.2.20	Präparation von Amyloid Enhancing Factor	34
2.2.21	Induktion der AA-Amyloidose im Mausmodell.....	34
2.2.22	Organpräparation für die immunhistologische Untersuchung.....	35
2.2.23	Färbung histologischer Schnitte mittels Kongorot	36
2.2.24	Immunhistologische Färbung zum Nachweis von murinem SAA im Gewebe	37
2.2.25	Markierung von B10B10-DFO mit Zirkonium-89	37
2.2.26	PET/CT mit Mäusen.....	38
2.2.27	Nachweis des B10B10 Antikörpers im AA-Amyloidose-Mausmodell.....	38
2.2.28	Autoradiographie.....	39
2.2.29	¹²⁵ I -Markierung von VHH-Antikörpern	40
2.2.30	Bindung von Amyloidfibrillen durch ¹²⁵ I-markierte VHH-Antikörper	40
2.2.31	SPECT/CT von VHH-Antikörpern in huIL-6-Mausmodell	40
3.	ERGEBNISSE	42
3.1	B10AP eignet sich als diagnostisches Agens im murinen Tiermodell	42
3.1.1	B10AP ist nicht toxisch	42
3.1.2	B10AP ist stabil im Mausserum	43
3.1.3	Es konnte keine unspezifische Bindung von B10AP <i>ex vivo</i> oder <i>in vivo</i> beobachtet werden	44
3.2	B10AP induziert eine auf IgG-basierte Immunogenität in NMRI Mäusen.....	46
3.3	Herstellung neuartiger Antikörperformate auf Grundlage der B10-Domäne.....	49
3.3.1	<i>In silico</i> Strukturvorhersage für B10B10AB und B10B10Dhlx.....	51

3.3.2	Multivalente Varianten der B10-Domäne wurden erfolgreich hergestellt	52
3.4	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der B10-Formate.....	56
3.4.1	Die B10-Formate binden A β (1-40)- und SAA-Fibrillen <i>in vitro</i>	57
3.4.2	B10AB und B10B10AB erkennen spezifisch murines Serumalbumin	58
3.4.3	Die neuartigen bivalenten Formate haben eine mit B10AP vergleichbare Affinität für Amyloidfibrillen	59
3.5	Immunogenität der verschiedenen B10-Antikörperformate.....	61
3.6	Etablierung des AA-Amyloidose-Mausmodells für die <i>in vivo</i> Charakterisierung neu generierter B10-Antikörperformate.....	64
3.6.1	Im Blutserum der Mäuse wurde eine erhöhte SAA-Konzentration festgestellt	65
3.6.2	Die Tiere entwickelten innerhalb von zwei Wochen den höchsten Grad der Amyloidose	66
3.7	<i>In situ</i> Bildgebung der AA-Amyloidose mithilfe des B10B10 Antikörpers	68
3.7.1	Radioaktive Markierung von B10B10 mit Desferrioxamin und Zirkonium-89	68
3.7.2	Detektion der AA-Amyloidose durch B10B10 im Silbernitrat-Induktionsmodell ohne die Verwendung von Kontrastmitteln	70
3.7.3	Detektion einer AA-Amyloidose durch B10B10 im Silbernitrat-Induktionsmodell unter Verwendung eines Kontrastmittels.....	76
3.7.4	Detektion der AA-Amyloidose durch B10B10 im transgenen huIL-6 Maus-modell ...	82
3.7.5	Zusammenfassung der bildgebenden Versuche	88
4.	Diskussion	91
4.1	Entwicklung neuartiger B10-Antikörperformate zur Detektion von Amyloidosen	91
4.2	Einige B10-Formate verursachen eine starke Immunogenität	94
4.3	Entwicklung eines funktionalen Detektionssystems zur Darstellung der AA-Amyloidose im Mausmodell.....	98
4.4	Ausblick.....	102

5.	Zusammenfassung.....	104
6.	Summary	105
7.	Referenzen.....	106
8.	Abkürzungsverzeichnis	115
9.	Anhang	117
10.	Danksagung	121
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	122

1. EINLEITUNG

1.1 Systemische Amyloidosen

Proteine sind lebensnotwendige und natürlich vorkommende Moleküle, die aufgrund ihrer Faltung eine bestimmte Funktion im Organismus übernehmen. Durch Störungen der Proteinfaltung können sich Polypeptidketten zu fibrillären Aggregaten, sogenannten Amyloidfibrillen, zusammenlagern (Sipe et al. 2016). Das hat zur Folge, dass die Proteine ihre ursprüngliche Funktion im Körper nicht mehr erfüllen können. Die mit den fibrillären Aggregaten verbundenen Erkrankungen werden als Amyloidosen zusammengefasst (Westermarck 2007). Zurzeit sind über 30 verschiedene extrazelluläre Fibrillenvorläuferproteine im Menschen bekannt, die mit jeweils einer spezifischen Amyloidose assoziiert werden (Sipe et al. 2016, Westermarck et al. 2015). Dabei werden zwei verschiedene Gruppen von Amyloidosen unterschieden. Zum einen lokal auftretende Amyloidosen, bei denen nur ein Organ betroffen ist (z.B. Alzheimer Erkrankung), und zum anderen systemische Amyloidosen (Abb. 1), bei denen gleichzeitig in mehreren Organen und Geweben, v.a. Leber, Milz, Herz und Nieren, aber ebenso im Bauchfett und Magen-Darm-Trakt, Aggregate auftreten (Sipe 1994, 2016). Ein Beispiel einer systemischen Amyloidose ist die Amyloid A (AA) Amyloidose (Chiti und Dobson 2006).

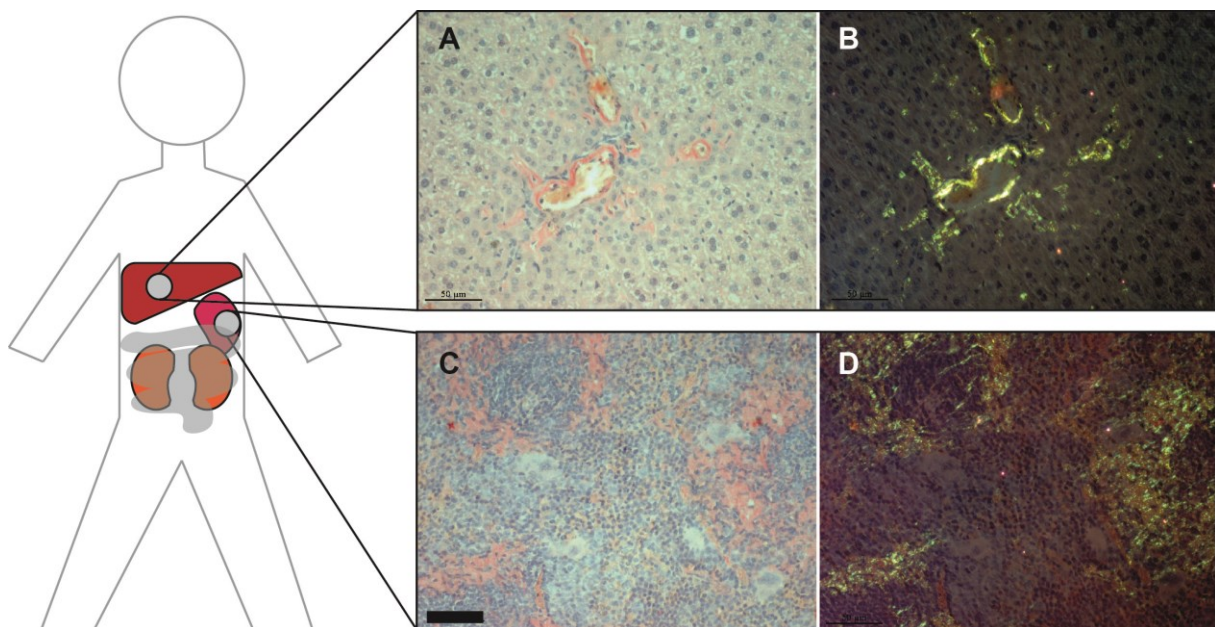


Abbildung 1: Die AA-Amyloidose zeichnen sich durch krankheitstypische Amyloidablagerungen u.a. in Leber (A, B) und Milz (C, D) aus. Die fibrillären Peptide lassen sich histologisch mithilfe von Kongorot nachweisen. Dabei erscheinen sie rot im Hellfeld (A, C) und gelbgrün doppelbrechend im Dunkelfeld (B, D) eines Polarisationsmikroskops.

1.1.1 Die AA-Amyloidose kann eine Folge chronischer Entzündungen sein

Die bei der systemischen AA-Amyloidose abgelagerten Proteine leiten sich vom Vorläuferprotein Serum Amyloid A (SAA) ab und werden als AA-Proteine bezeichnet. Wie bei allen anderen Amyloidosen ist die Konzentration des Vorläuferproteins entscheidend für die Bildung von Amyloidablagerungen. Die AA-Amyloidose ist häufig mit einer entzündlichen Grunderkrankung (Abb. 2), z.B. bakteriellen Infektionen (z.B. Tuberkulose) oder chronischen Entzündungen (z.B. rheumatoide Arthritis (Blank et al. 2015)) assoziiert (van der Hilst 2011, Röcken und Shakespeare 2002). Bei den genannten Erkrankungen wird die Leber durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α) zur Bildung des Akute-Phase-Proteins SAA angeregt. Während einer inflammatorischen Reaktion kann so die Konzentration des SAA von rund 1-2 mg/l auf 1000 mg/l ansteigen (Husby et al. 1994, Röcken und Shakespeare 2002). Hält diese hohe Konzentration über einen längeren Zeitraum an, können sich Protein AA-Fibrillen beispielsweise in Leber, Nieren, Milz und dem Magen-Darm-Trakt bilden und ablagern (Hazenbergh und van Rijswijk 2000). Das damit verbundene Krankheitsbild zeichnet sich vornehmlich durch Nephropathie, vor allem Proteinurie und Niereninsuffizienz, aus. Es können aber auch Herzinsuffizienz und Beeinträchtigungen im Gastrointestinaltrakt auftreten (Westermarck et al. 2015, Röcken 2009).

1.1.2 SAA ist das Vorläuferprotein des Protein AA

Humanes SAA ist ein Proteinhexamer bestehend aus 104 Aminosäuren langen und ca. 12 kDa großen Untereinheiten (Abb. 2), die aus vier Helixbündeln bestehen (Lu et al 2014). Produziert wird es vor allem in der Leber als Akute-Phase-Protein unter der Kontrolle der Interleukine (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor α (TNF α). Die Funktion von SAA ist nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass es einen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort (z.B. Opsonierung), sowie auf den Transport von Lipoproteinen und Cholesterin im Körper hat (Frame und Gursky 2016, Kisilevsky und Manley 2012).

In Amyloidfibrillen von AA-Amyloidose Patienten wurde bisher hauptsächlich C-terminal verkürztes SAA nachgewiesen, die AA-Proteine (Röcken und Shakespeare 2002). Dabei treten vor allem AA₁₋₇₆ Varianten auf (Husby et al. 1994, Röcken et al. 2005, Yamada et al. 1995). Volllängen SAA konnte bisher nicht als Hauptspezies in AA-Fibrillen detektiert werden. Somit ist anzunehmen, dass die Dissoziation des Hexamers und die Spaltung von SAA im amyloidogenen Charakter des Proteins resultiert und die Aggregation zu Fibrillen hervorruft (Lu et al. 2014, Westermarck et al. 2015).

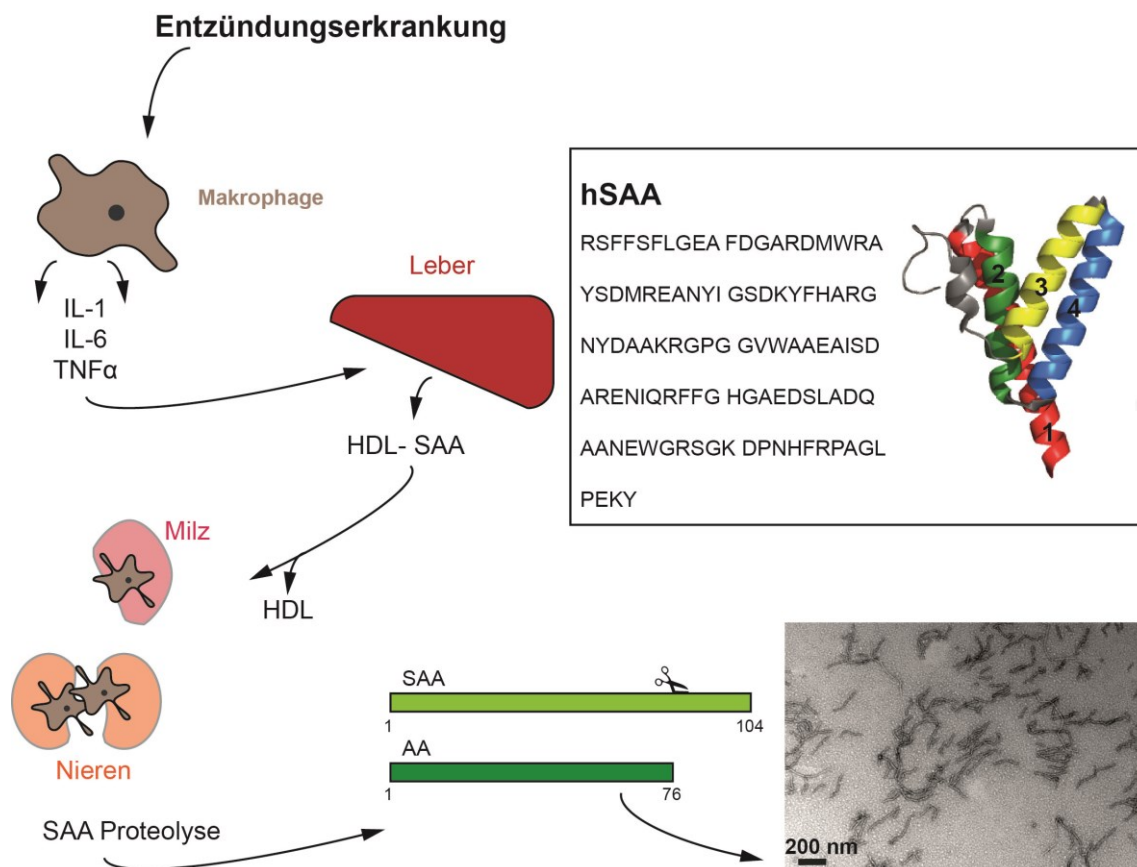


Abbildung 2: Serum Amyloid A (SAA) ist ein Hexamer, dessen Monomere aus vier Helices bestehen. Das Akute-Phase-Protein SAA wird infolge eines langanhaltenden inflammatorischen Stimulus in der Leber gebildet. Über die Blutbahn gelangt es, an HDL (*High Density Lipoprotein*) gekoppelt, in die Milz und die Nieren, wo es zuvor vom HDL gespalten wird. In den dort vorhandenen Makrophagen wird SAA C-terminal gespalten. Das resultierende AA-Peptid kann zu Fibrillen aggregieren und lagert sich in der Milz und den Nieren ab (humanen SAA1 (hSAA1) pdb: 4IP9, Lu et al. 2014).

1.1.3 Amyloidfibrillen sind ein Bestandteil von Amyloidablagerungen im Gewebe

Die Grundlage aller Amyloidosen sind Amyloidablagerungen. Amyloid (= stärkeähnlich) beschreibt extrazellulär auftretende pathogene Polypeptidfibrillen, die eine cross- β -Struktur aufweisen und aufgrund ihrer regelmäßigen, normalerweise unverzweigten Struktur in der Lage sind, den Azofarbstoff Kongorot zu binden (Sipe et al. 2016). Der Prozess der Fibrillenbildung wird als Aggregation bezeichnet. Ausgehend von zumeist natürlich vorkommenden, jedoch fehlgefalteten Polypeptiden bzw. Proteinen, die als Monomere bezeichnet werden, bilden sich nach dem Erreichen einer kritischen Konzentration zunächst teilweise im β -Faltblatt strukturierte Oligomere. Diese löslichen und teils toxischen Oligomere bilden in einem weiteren Schritt Protofibrillen, die sich durch eine kurze und unregelmäßige Morphologie auszeichnen. Den höchsten Anteil an β -Faltblattstrukturen haben die reifen Fibrillen, die durch ihre regelmäßige morphologische Beschaffenheit in der Lage

sind, Farbstoffe wie Kongorot und Thioflavin T spezifisch zu binden (Scheidt et al. 2011, Goldsbury et al. 2000, Walsh et al. 1997, Harper et al. 1997).

Es wurde nachgewiesen, dass neben den fibrillären Bestandteilen weitere Komponenten in Amyloidablagerungen auftreten. Dazu zählen Glykosaminoglykane (GAGs) (Snow et al. 1987), Lipide (Gellermann et al. 2005, Kollmer et al. 2016) und das Serum Amyloid P (SAP) (Pepys 2006). Ein Beispiel für die GAGs sind Heparansulfate. Diese unterscheiden sich in amyloid-assoziiertem Gewebe von gesundem Gewebe in ihren biochemischen und elektrochemischen Eigenschaften (Lindahl et al. 1997). Ihr grundsätzlicher Zusammenhang mit Amyloidablagerungen (Li et al. 2005) macht Heparansulfate zu einem weiteren interessanten Ansatzpunkt für die Diagnostik und Therapie einer systemischen AA-Amyloidose.

1.2 Mausmodelle der systemischen AA-Amyloidose

1.2.1 Induktion der AA-Amyloidose durch Inflammationsstimuli in Mäusen

Da die AA-Amyloidose auch im Zusammenhang mit einigen parasitären Krankheiten stehen, wurde das Alveolar Hydatid Cyst (AHC)-Mausmodell entwickelt. In diesem Modell werden männliche C57BL/6J (H-2^b) Mäuse mit Larven des kleinen Bandwurms *Echinococcus multilocularis* infiziert (Ali-Khan et al. 1983). Dies induziert Inflammationsprozesse und mündet in einer erhöhten SAA-Serumkonzentration. Nach sechs Tagen sind Amyloidablagerungen in Milz, Leber und im Gastrointestinaltrakt nachweisbar (Ali-Khan et al. 1996).

Statt der Infektion mit Parasiten können Injektionen von Casein (Janigan 1965, Skinner et al. 1977), komplettem Freud-Adjuvans (Stenstad et al. 1994), bakteriellen Lipopolysacchariden oder Silbernitrat (Ishihara 1973) zur Induktion einer AA-Amyloidose eingesetzt werden. Die Induktion mittels Silbernitrat stellt ein hoch relevantes Tiermodell der Amyloidose dar, da in diesem Modell die gleichen systematischen Amyloidablagerungen wie im Menschen (Sipe et al. 1978, Teilmann 1964) nachgewiesen wurde. Silbernitrat wird vornehmlich in experimentellen Studien in weiblichen Naval Medical Research Institute (NMRI) Mäusen eingesetzt (Johan et al. 1998; Lundmark et al. 2002, 2005). Die genannten Agenzien, wie Silbernitrat, setzen einen inflammatorischen Stimulus und regen die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF α in den Mäusen an. Dadurch werden die Hepatozyten zur vermehrten Bildung von SAA angeregt (Snow et al. 1991, Sipe 1994). AA-Fibrillen findet man hauptsächlich in der perifollikulären Zone der Milz, den Sinusoiden der Leber, dem Mesangium der Nieren und dem Gastrointestinaltrakt (Kisilevsky und Young 1994).

Da die Induktion der AA-Amyloidose mittels Silbernitrat mehrere Wochen dauert, kann diese Zeit, durch zusätzliche Injektion von Proteinextrakt aus AA-amyloidbelasteten Mausorganen, wie Milz oder Leber (Pras et al. 1968, Willerson et al. 1969), auf wenige Tage verkürzt werden (Ganowiak et al. 1994). Bei dem verwendeten Proteinextrakt zur beschleunigten Ausbildung einer Amyloidose, in dem AA-Fibrillen als aktive Komponente identifiziert wurden (Lundmark et al. 2002), spricht man von *Amyloid Enhancing Factor* (AEF, Axelrad et al. 1982). Als AEF können außerdem natürlich vorkommende Fibrillen wie z.B. die Seide eines Seidenspinners (Lundmark et al. 2005) oder amyloid-artiger *in vitro* Fibrillen, bestehend aus synthetischen Peptiden (Ganowiak et al. 1994), dienen. Die β -faltblattreichen Strukturen können als Aggregationskeim bei der Ausbildung einer Amyloidose dienen (Johan et al. 1998). Reines AA-Protein, die Serum Amyloid P Komponente oder Glykosaminoglykane allein haben diese Wirkung dagegen nicht (Gruys et al. 1994, Kisilevsky und Young 1994).

1.2.2 Transgene Mausmodelle zur Untersuchung der AA-Amyloidose

Neben den induzierbaren Mausmodellen wurden ebenfalls transgene Mausmodelle entwickelt. Zum einen gibt es ein „SAA activating factor 1“ überexprimierendes Mausmodell, in welchem die Tiere nach zusätzlicher Injektion von Azocasein innerhalb von 42 Tagen starke Amyloidablagerungen entwickeln (Ray et al. 2004, 2006). Zum anderen wurde eine Mauslinie entwickelt, in der die Bildung von hepatischem SAA durch die orale Gabe von Doxycyclin induziert wird (Kistner et al. 1996). SAA wird dabei unabhängig von einer zugrunde liegenden Entzündung überexprimiert (Simons et al. 2013). Nach der zusätzlichen Injektion von AEF können starke Amyloidablagerungen bereits nach zwei Tagen in Leber und Milz detektiert werden.

Ein weiteres transgenes Modell ist das H2/huIL-6 Mausmodell (Kovalchuk et al. 2002). Die Mäuse mit einem Balb/c-Hintergrund exprimieren konstitutiv humanes IL-6 unter Kontrolle des H-2L^D Histokompatibilitätspromotor (Suematsu et al. 1992). Dies resultiert in einer Überproduktion von SAA, wodurch die Mäuse nach drei Monaten eine AA-Amyloidose mit fibrillären Ablagerungen in Leber, Milz und Nieren ausbilden. Nach weiteren sechs Monaten sind starke Amyloidablagerungen nachweisbar (Salomon et al. 1999). Durch Injektion von AEF in zwei Monate alte Tiere, konnten bereits nach drei bis vier Wochen bedeutende Amyloidablagerungen beobachtet werden (Wall et al. 2005). Dabei stellt dies ein einheitliches Modell im Gegensatz zum Silbernitrat-induzierten AA Amyloid-Mausmodell dar. Die IL-6-Produktion wird direkt und nicht, wie bei den Induktionsmodellen z.B. durch Silbernitrat, indirekt ausgelöst (Salomon et al. 1999).

1.3 Diagnostik der systemischen AA-Amyloidose

Systemische Amyloidosen werden standardmäßig histologisch mittels rektaler oder Bauchfettbiopsie diagnostiziert (Westermarck et al. 2015).

Es gibt verschiedene Farbstoffe, um Amyloid im Gewebe von histologischen Schnitten zu färben. Dabei wird die konservierte regelmäßige Struktur von reifen Amyloidfibrillen ausgenutzt. Kongorot stellt den „Goldstandard“ dar (Puchtler et al. 1962). Der Azofarbstoff erscheint, aufgrund seiner Struktur, bei einer polarisationsoptischen Untersuchung von Fibrillen im Dunkelfeld in einer charakteristischen grüngelblichen Doppelbrechung. Ein weiterer Farbstoff, der Amyloidfibrillen bindet, ist Thioflavin T. Bindet dieser Fluoreszenzfarbstoff an Amyloidfibrillen, kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des Exzitations- und Emissionsmaximums. Thioflavin T kann ebenfalls in der Histologie zur Detektion von Amyloidfibrillen eingesetzt werden, ist jedoch weniger spezifisch als Kongorot (Westermarck et al. 2015). Der Nachteil der Kongorotfärbung ist die, im Vergleich zu Thioflavin T, geringere Sensitivität. Deshalb bedarf es einer großen Menge an Amyloid im Gewebe und einer erfahrenen Person, die die Kongorotfärbung und Auswertung korrekt durchführen kann (Pepys 2006, Westermarck et al. 2015).

Invasive Methoden wie Biopsien zählen zur Standarddiagnostik, weisen allerdings einige Nachteile auf. Es kann beispielsweise zu Komplikationen wie Blutungen und Infektionen kommen. Da sich die Probenentnahme bei einer Biopsie auf einen sehr kleinen Gewebeanteil beschränkt und nicht das gesamte Zielorgan (z.B. Leber oder Milz) erfasst, werden häufig falschnegative Befunde erstellt. So wurden laut Hawkins (2002) 20 – 50% der Patienten mit systemischer Amyloidose trotz rektaler oder Bauchfettbiopsie nicht erkannt. Außerdem ermöglichen Biopsien keine Aussagen zur Amyloidverteilung und dem Voranschreiten der Krankheit.

Für die Entwicklung einer nicht-invasiven Diagnostik, bei der der komplette Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden kann, ist das oben genannte Kongorot ungeeignet. Es ist sehr instabil und wird als krebserregend eingestuft. Weiterhin ist Thioflavin T aufgrund seines genannten weniger spezifischen Charakters ungeeignet.

Das natürlich vorkommende Plasmaprotein Serum Amyloid P (SAP) ist ein nicht-fibrillärer Bestandteil von Amyloidablagerungen und wird als „Goldstandard“ bei der nicht-invasiven Diagnostik und klinischen Überwachung von Amyloidosen in Europa eingesetzt (Hazenbergh et al. 2006, Hawkins und Pepys 1995, Hawkins et al. 1990). SAP ist ein 127 kDa Glykoprotein und gehört zur Familie der Pentraxine. Aufgrund der Assoziation des Proteins zu allen bisher bekannten Amyloidosen entwickelten Hawkins et al. radioaktiv markiertes SAP, welches seit 1990 als Diagnostikum in Großbritannien verwendet wird. Das ^{125}I -SAP wird beispielsweise in der Szintigrafie zur Bildgebung

der AL (aggregierte leichte Ketten eines IgG) und AA-Amyloidose eingesetzt. Da SAP spezifisch und irreversibel an Amyloidfibrillen bindet, besteht die Möglichkeit einer quantitativen Aussage zum Amyloidgehalt im Gewebe (Hawkins et al. 1988, 2002). SAP wird in Europa häufig genutzt, wurde jedoch in den USA nicht durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Die FDA begründete die Nicht-Zulassung des, aus humanem Blutplasma isolierten, SAP, aufgrund seiner Sensibilität gegenüber den stringenten viral-inaktivierenden Methoden. Viele Gruppen arbeiten daher stetig an weiteren Amyloidbindern für die Bildgebung.

Die monoklonalen Antikörper 2A4, 7D8 und 8G9 detektieren Amyloid A-Fibrillen in Mäusen. Sie binden mit nanomolarer Affinität sequenzspezifisch die Aminosäuren 71-75 des murinen AA- Proteins (GHEDT), welche C-terminal nach der Proteolyse des SAA vorliegen. Das zirkulierende SAA-Protein wird nicht erkannt (Wall et al. 2011a). Die Herstellung dieser Antikörper erfolgt durch Immunisierung von Mäusen und anschließender Generierung von Hybridomazellen auf einem sehr aufwendigen und kostspieligen Weg, was die Herstellung größerer Mengen zur klinischen Verwendung bisher erschwert.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erkennung von Amyloidablagerungen sind die ihnen aufgelagerten Heparansulfate. Sie unterscheiden sich biochemisch hinsichtlich des Sulfatierungsgrads im Amyloid-assoziierten und gesunden Gewebe.

Zum einen wurde das Peptid p5 entwickelt, welches den Amyloidfibrillen aufgelagertes Heparansulfat aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen bindet. Das p5 ist ein synthetisches und helikales Peptid, das aus 31 Aminosäuren, hauptsächlich Lysin, Alanin und Glutamin, besteht. Die Weiterentwicklung von p5 ergab das p5+14, ein um 14 Aminosäuren verlängertes p5 Peptid. Dieses Peptid ist, aufgrund von zusätzlichen Lysinen und Glutaminen, so stark positiv geladen, dass es die anionische Amyloidfibrillenstruktur direkt binden kann. Es wurde bereits innerhalb präklinischer Studien erfolgreich in AA-Amyloidose Mäusen mit Single-Photon-Emissions-Computertomografie (SPECT) Bildgebung getestet (Wall et al. 2015, Martin et al. 2016). Die Varianten p5R (Wall et al. 2013), bei dem alle Lysine durch Arginine ersetzt wurden, und ^{aa}p5 (Martin et al. 2017), dessen ersten drei N-terminalen Aminosäuren als D-Enantiomere vorliegen, erweitern die Eigenschaften des Peptids p5 hinsichtlich Affinität (p5R) und Dehalogenierungsprozessen *in vivo* (^{aa}p5).

Weiterhin wurde das *single chain* Antikörperfragment NS4F5 durch *phage display* gegen Heparansulfat selektiert und bereits erfolgreich für die Bildgebung einer AA-Amyloidose im Mausmodell angewandt (Smits et al 2006, Wall et al. 2012). Die rekombinante Herstellung des Antikörpers erfolgte bisher nur im Labormaßstab.

1.4 Therapie der systemischen AA-Amyloidose

Um eine systemische Amyloidose wie die AA-Amyloidose zu therapieren, wird meist die zugrunde liegende Entzündungserkrankung, beispielsweise rheumathische Arthritis, behandelt. Dabei wird Folgendes angenommen: wird die Bildung von Interleukin (IL-) 6, IL-1 oder Tumornekrosefaktor TNF- α verringert, wird weniger Serum Amyloid A (SAA) von den Hepatozyten gebildet und es liegt weniger Vorläuferprotein des krankheitsassoziierten Amyloid A Proteins vor (Pettersson et al. 2008).

Tocilizumab ist ein humanisierter anti-IL-6 Rezeptor IgG-Antikörper. Er bindet an IL-6 Rezeptoren von aktivierten B-Zellen sowie Plasmazellen und blockiert die durch IL-6 kontrollierte Signaltransduktion. Das seit 2009 in Europa und seit 2010 in den USA zugelassene Therapeutikum wird erfolgreich im Patienten angewendet (Ogata und Tanaka 2012, Inoue et al. 2010, Nishida et al. 2009, Okuda et al. 2014). Weitere Beispiele zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis sind die anti-TNF Antagonisten Infliximab, Adalimumab und Etanercept, welche ebenfalls erfolgreich die Konzentration von SAA senken (Ogata und Tanaka 2012, Pettersson et al. 2008).

Ein zweiter Therapieansatz sind die den Amyloidfibrillen aufgelagerten Substanzen. Glykosaminoglykane (GAGs, z.B. Heparansulfate) und SAP stabilisieren die proteinogenen Aggregate und verhindern deren Abbau. Eine Extraktion von GAGs oder SAP kann zur Auflösung der gesamten Amyloidablagerung führen.

Tests mit Sulfonaten oder Sulfaten wurden bereits in den 1990er Jahren erfolgreich durchgeführt (Kisilevsky et al. 1995). Eprodisat ist ein kleines, durch Sulfonierung negativgeladenes Molekül. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Heparansulfat, ist Eprodisat in der Lage die Interaktionen zwischen den aggregierten Proteinen und den ihnen aufgelagerten GAGs innerhalb der Amyloidablagerung zu beeinflussen (Manenti et al. 2008, Rumjon et al. 2012). In Studien mit Amyloidosepatienten wurde gezeigt, dass Eprodisat die Ausbildung einer Amyloidose-assoziierten Niereninsuffizienz verlangsamen kann (Dember et al. 2007). Jedoch scheiterte die Zulassung als Medikament 2016 in Studien der klinischen Phase 3.

Andere therapeutische Ansätze nutzen Heparanase, die durch die Fragmentierung von Heparansulfat und folglich Instabilisierung des Amyloids ebenfalls diese Ablagerungen minimieren kann. In transgenen Mäusen, welche die humane Heparanase überexprimierten, konnte keine AA-Amyloidose induziert werden (Li et al. 2005).

R-1-[6-[R-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-Carboxylsäure (CPHPC) ist ein kompetitiver Inhibitor von SAP. Die Palindromstruktur des CPHPC kann zwei pentamere SAP Moleküle zu einem Dekamer quervernetzen. Diese werden schnell durch die Leber abgebaut. CPHPC wurde bereits erfolgreich im Patienten getestet (Pepys et al. 2002). Weiterentwickelte Studien wurde

CPHPC gemeinsam mit therapeutischen anti-SAP Antikörpern im Patienten eingesetzt (Sahota et al. 2015).

Es wurden bereits viele potentielle Therapeutika für AA-Amyloidose basierend auf verschiedenen Grunderkrankungen entwickelt (Westermarck et al. 2015). Eine Übersicht zu weiteren Kandidaten bietet das Review von Pettersson et al. 2008.

1.5 *In situ* Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomografie

Die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) macht sich den spontanen Zerfall eines protonenreichen Atomkerns zu Nutze (Abb. 3). Dabei wird ein Positron β^+ freigesetzt. Trifft das Positron auf ein Elektron β^- aus der Umgebung kommt es zur Annihilation. Dabei entstehen zwei Gammaphotonen γ mit einer Energie von 511 keV. Diese strahlen in entgegengesetzte Richtungen ab und treffen im PET auf Szintillationskristalle, die in einem Detektorring angeordnet sind. Dort erzeugen sie messbare Lichtblitze. Die Linie zwischen den beiden gemessenen Lichtblitzen wird als *Line of Response* bezeichnet. Im Schnittpunkt dieser Linien befindet sich die Radiosonde im Gewebe. Mittels Computer kann ein dreidimensionales Bild rekonstruiert werden.

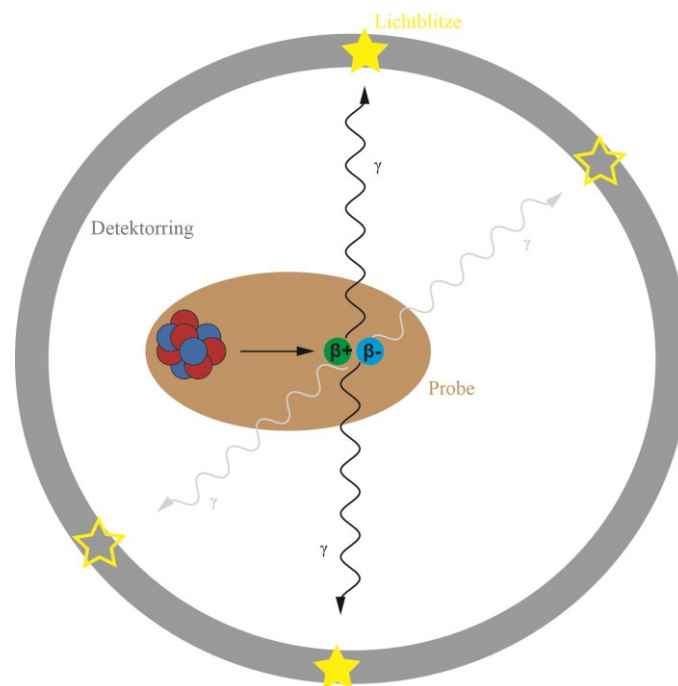


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Elektron-Positron Annihilation innerhalb einer Probe im PET-Scanner. Durch spontanen Zerfall eines Atomkerns wird ein Positron β^+ (grün) freigesetzt. Trifft dieses auf ein Elektron β^- (blau) entstehen zwei Gammaphotonen γ , die in entgegengesetzte Richtung abstrahlen und Lichtblitze auf dem Detektor innerhalb des Detektorrings erzeugen. Die Position der Probe lässt sich durch den Schnittpunkt mehrerer zwischen zwei Lichtblitzen entstehenden Linien bestimmen (modifiziert nach Kapoor et al. 2004 und Rohren et al. 2004).

Die PET Messung ist mit der Computertomografie (CT) kombinierbar. Bei der CT emittiert eine Quelle Röntgenstrahlung. Beim Durchdringen der Probe wird die Strahlung abgeschwächt und absorbiert. Je dichter die Probe ist, umso stärker ist die Abschwächung der Strahlung die den Detektor erreicht und umso heller erscheinen diese Bereiche auf dem späteren Bild. Knochen erscheinen folglich heller als weiche Organe. Mithilfe von Kontrastmitteln, wie Fenestra VC (Willekens et al. 2009), Iohexol CT oder ExiTron nano 6000 (Boll et al. 2011), ist es möglich verschiedenen Organe (z.B. Leber und Milz) im CT zu unterscheiden.

Durch die Kombination von PET und CT lassen sich sowohl anatomische Merkmale als auch metabolische Prozesse darstellen. Die Aufnahme von mehreren Projektionen entlang einer Rotationsachse um die Probe, ermöglicht außerdem die Erstellung hochauflösender dreidimensionaler Bilder.

Als Radiosonden im PET/CT eignen sich β^+ -Strahler wie Kohlenstoff-11, Fluor-18, Iod-124, Gallium-68 und Zirkonium-89. 2-Deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-Glucose wird beispielsweise bei der Visualisierung von AL Amyloidosen (Glaudemans et al. 2013) und ^{11}C -Pittsburgh compound b bei der Alzheimer Erkrankung eingesetzt (Klunk et al. 2004). Mithilfe von Iod-124 markiertem Peptid p5 (s. 1.3.) konnte die AA-Amyloidose im Tiermodell detektiert werden (Martin et al. 2014). ^{67}Ga -Citrat kann Aussagen über inflammatorische Prozesse liefern (Berstein 1998, Cytawa et al. 2014) und Zirkonium-89 lässt sich sehr gut über den Chelator Desferrioxamin (DFO) an monoklonale Antikörper koppeln und somit im Immuno-PET, bei der eine Radiosonde an einen Antikörper gekoppelt wird, einsetzen (Vosjan et al. 2010). Dabei eignet sich ^{89}Zr wegen seiner Halbwertszeit von 78,4 Stunden besonders gut für die Markierung von monoklonalen Antikörpern, die aufgrund ihrer Struktur und Eigenschaften bis zu vier Tage benötigen, um ihr Ziel im Organismus zu erreichen (Vosjan et al. 2010). Weitere Radiosonden, wie Gallium-68 ($t_{1/2} = 1,13 \text{ h}$), Fluor-18 ($t_{1/2} = 1,83 \text{ h}$), Kupfer-64 ($t_{1/2} = 12,7 \text{ h}$) und Iod-124 ($t_{1/2} = 100,3 \text{ h}$) sind in stetiger Weiterentwicklung für die Immuno-PET. Mit diesen Radiosonden und der Möglichkeit der gentechnischen Veränderung von Antikörpern hin zu kleinen hochfunktionalen Bindern, ist es möglich, ein großes Repertoire an radioaktiven Bindern für die Bildgebung mittels Immuno-PET/CT zu generieren.

1.6 Rekombinante diagnostische Proteine und Antikörper

Immunglobuline G (IgG) sind die biotechnologisch wichtigsten Antikörper. Ein IgG besteht aus zwei identischen leichten (L) und zwei identischen schweren (H) Ketten (Abb. 4 A). Die leichte Kette besteht aus einer N-terminalen variablen Domäne (VL) und einer C-terminalen konstanten Domäne (CL). Die schwere Kette besteht ebenfalls aus Domänen, wobei hier eine variable (VH) und drei kon-

stante Domänen (CH1, CH2, CH3) unterschieden werden. Die variablen Domänen (VL und VH) bestehen aus drei hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs), die sich jeweils in Schleifen ausbilden und maßgeblich an der Antigenbindung beteiligt sind. Die Regionen außerhalb der CDR werden als *framework residues* (FR) bezeichnet.

Ein Antikörper besteht funktional aus zwei antigenbindenden Fragmenten, den Fabs, und einer konstanten Region, bestehend aus CH2- und CH3-Domänen, die Fc-Region genannt wird. Fabs und die Fc-Region sind über eine flexible Gelenkregion miteinander verbunden. Zusätzliche Stabilität innerhalb des Antikörpers besteht aufgrund je einer Disulfidbindung zwischen den CL- und CH1-Domänen und durch zwei Disulfidbindungen innerhalb der Gelenkregion.

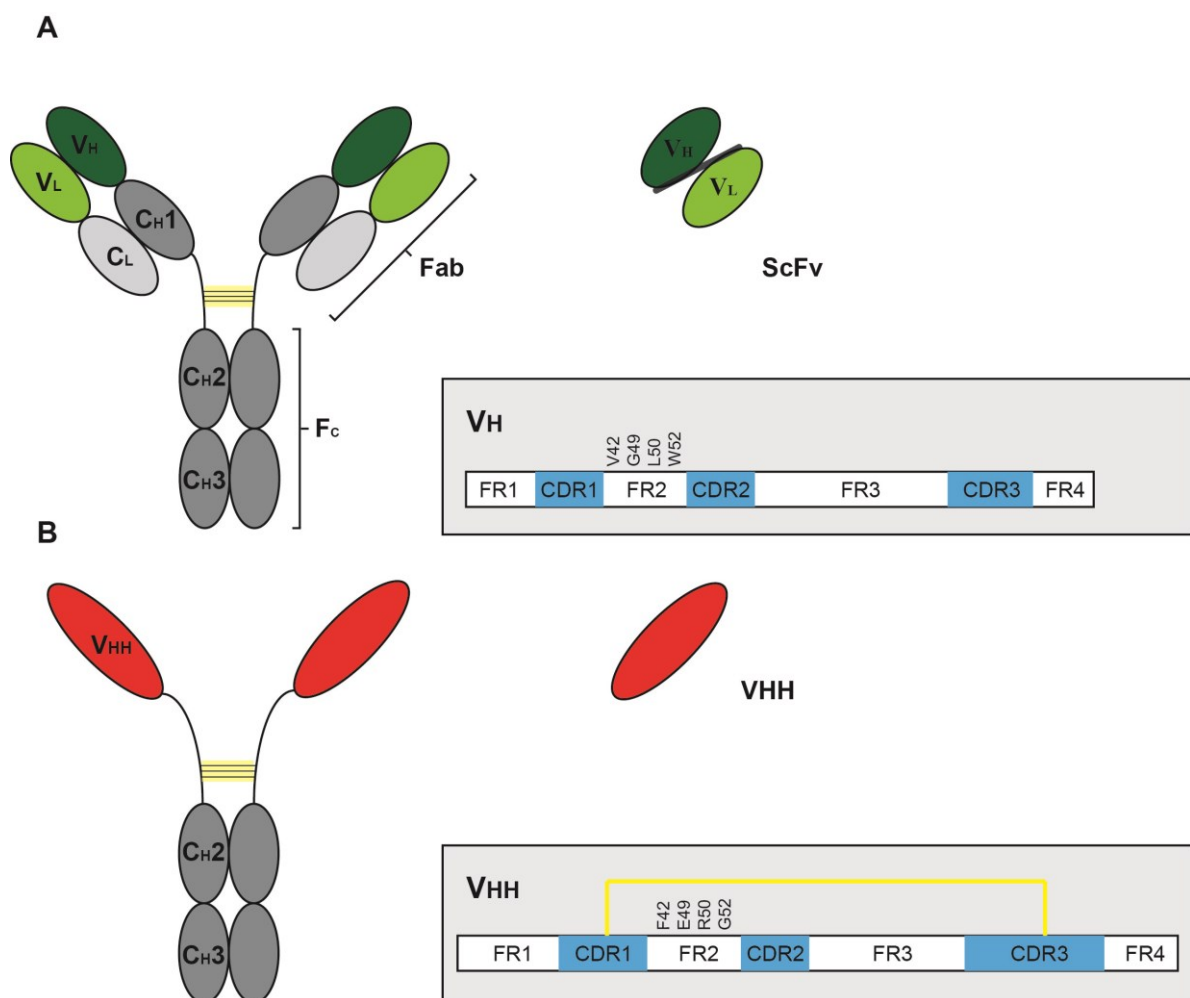


Abbildung 4: Klassische IgG-Antikörper (A) und Schwerekettenantikörper (B) unterscheiden sich morphologisch. Die antigenbindende Domäne der Schwerekettenantikörper VHH ist deutlich größer als die VL Domäne der IgGs. Dabei sind v.a. die CDR1 und CDR3 verlängert. Die Stabilität der VHH gegenüber der VH Domäne wird häufig durch eine zusätzliche Disulfidbindung (gelb) erhöht. Vier Aminosäuresubstitutionen im FR2 der VHH- Domäne kompensieren die fehlende VL Domäne und sorgen für eine erhöhte Hydrophilie (nach Myuldermans 2001).

Der Fc-Teil eines Antikörpers ist entscheidend bei der Rekrutierung von Fc γ -Rezeptor (Fc γ R)-tragenden Immunzellen, wie z.B. Makrophagen und Natürlichen Killer (NK)-Zellen innerhalb der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Eine weitere wichtige Immunkaskade, bei der der Fc-Teil eines Antikörpers entscheidend ist, ist die Komplementabhängige Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, CDC). Durch ihr Bindungsverhalten beeinflusst die Fc-Region maßgeblich die Serumhalbwertszeit eines Antikörpers. Diese liegt normalerweise für einen humanen IgG1-Antikörper bei drei Wochen, für Antikörperfragmente ohne Fc-Teil bei einigen Stunden. Die Fc-Region schützt folglich IgG-Antikörper vor deren Abbau (Kim et al. 2005).

Antikörper stellen eine gute Möglichkeit zur Diagnostik und Therapie vieler Erkrankungen dar. Die Herstellung von therapeutischen monoklonalen Antikörpern ist beispielsweise durch die nötige N-Glykosylierung nur sehr aufwendig und kostenintensiv in Säuger- oder Hefezelllinien möglich (Spadiut et al. 2014). Die biotechnologische Herstellung funktionaler nicht-glykosylierter IgG-Antikörper mithilfe von bakteriellen Expressionssystemen (z.B. *Cyclonals*) ist von enormem industriellen Interesse und wird weiter vorangetrieben (Robinson et al. 2015).

Im Gegensatz dazu können die Fragmente eines Antikörpers wie Fab und scFv (kovalent verbundene VH und VL Domänen) ohne Glykosylierung bereits erfolgreich mit hohen Expressionsraten in unterschiedlichen Mikroorganismen fermentiert werden (Spadiut et al. 2014). Da Fab-Fragmente (~55 kDa) und scFv (~28 kDa) deutlich kleiner sind als monoklonale Antikörper (~150 kDa), penetrieren sie besser ins Gewebe und können besser über die Niere (Holliger et al. 2005), die eine Filtergrenze von ca. 70 kDa (Strohl 2015) besitzt, ausgeschieden werden. Den Fab und scFv Antikörperfragmenten fehlt die Fc-Region. Deshalb können sie nicht in die o.g. Immunkaskaden eintreten. In der Folge weisen sie eine deutlich niedrigere Immunogenität im Vergleich zum IgG auf. Jedoch wurde in der Literatur beschrieben, dass der hydrophile Glycin-Serin-Peptidlinker innerhalb des scFv häufiger zur Aggregation der Fragmente führen kann (Whitlow et al. 1993, Muyldermans 2001).

1.6.1 VHH sind die kleinsten funktionalen Antikörperformate

Bei den Kamelen (*Camelidae*) wurden, neben den klassischen IgG-Antikörpern, sogenannte Schwere-Ketten-Antikörper im Blutserum gefunden. Sie bestehen lediglich aus den beiden schweren Ketten eines Antikörpers (Abb. 4 B), denen die konstanten CH1-Domänen fehlen (Hamers-Casterman et al. 1993). Die funktionelle Einheit dieser Antikörper besteht aus der ca. 15 kDa kleinen variablen VHH-Domäne, auch *nanobody* genannt.

Entsprechend der VH-Domäne der konventionellen IgG-Antikörper, besteht die VHH-Domäne aus drei hypervariablen Regionen (CDR). Dabei sind diese, vor allem die dritte CDR, länger als in der VH Domäne. Außerdem wurde häufig eine zusätzliche Disulfidbindung zwischen CDR1 und CDR3 nachgewiesen. Es wird angenommen, dass auf diese Weise die Stabilität der VHH-Domäne erhöht und die fehlende VL-Domäne bei der Antigenbindung kompensiert wird. Substitutionen von hydrophoben durch hydrophile Aminosäuren außerhalb der CDRs erhöhen die Stabilität und Löslichkeit der VHHs. Daher kann die VHH-Domäne auch einzelständig als Antikörperfragment verwendet werden (Muyldermans 2001, 2013). Monoklonale Antikörper binden das Antigen über ein konkaves Paratop. VHH-Antikörper hingegen bilden ein konvexes Paratop aus, welches für IgG-Antikörper unzugängliche Epitope erreichen kann (Stijemans 2004). Es wird angenommen, dass die hochaffinen *nanobodies* neben der guten Gewebegängigkeit, zusätzlich eine niedrige Immunogenität aufweisen. Dies wird auf das Fehlen des Fc-Teils zurückgeführt (Muyldermans 2001). Alle genannten Eigenschaften der VHH-Domäne stellen sehr gute Voraussetzungen für die Bildgebung im Tiermodell dar. Zusätzlich positiv wirkt sich die schnelle Exkretion von ungebundenen Konjugaten auf die Bildgebung aus. Die Ganzkörperexposition wird dadurch gering gehalten. Eine durch ihre Molekülgröße zu kurze Serumhalbwertszeit der VHH im Vergleich zu den IgG-Antikörpern kann u.a. durch PEGylierung (Chapman et al. 1999) und PASylierung (Schlapschy et al. 2013), d.h. durch das Anhängen von PEG oder einer Aminosäuresequenz bestehend aus Prolin, Alanin und Serin, erhöht werden.

Schwere-Ketten-Antikörper können durch Immunisierung eines Kamels mit dem entsprechenden Antigen gewonnen werden. Dazu wird dem Kamel nach der Immunisierung Blut entnommen, Lymphozyten extrahiert, das entsprechende Gen für die VHH-Domänen kloniert und mithilfe von *phage display* auf positive Binder gegen das eingesetzte Antigen selektiert. Ist keine Immunisierung möglich, kann man auf synthetische oder halb-synthetische VHH-Bibliotheken zurückgreifen. Antigen-bindende VHH-Domänen können nach erfolgreicher Selektion kostengünstig und in sehr hohen Ausbeuten rekombinant durch Hochzelllichtfermentation hergestellt werden (Muyldermans 2013). Die Reinigung kann durch die Expression im Periplasma (Skerra 1993) und gentechnische Modifikation der VHH-Domänen, durch z.B. Anhängen eines His-Tags, stark vereinfacht werden. Das macht die *nanobodies* zu guten Kandidaten für die Herstellung von rekombinanten Pharmaproteinen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften (z.B. bispezifische und bivalente Binder).

1.6.2 Herstellung von molekularen Bindern mithilfe von Protein Engineering

Für bestimmte Anwendungsbereiche ist es sinnvoll, molekulare Binder mit zwei verschiedenen Bindungseigenschaften (Bispezifität) oder doppelter funktionaler Einheit (Bivalenz = Zweiwertigkeit) herzustellen. Dafür sind die kleinen und gentechnisch leicht zu modifizierenden *nanobodies* besonders gut geeignet.

Bispezifität



Bivalenz

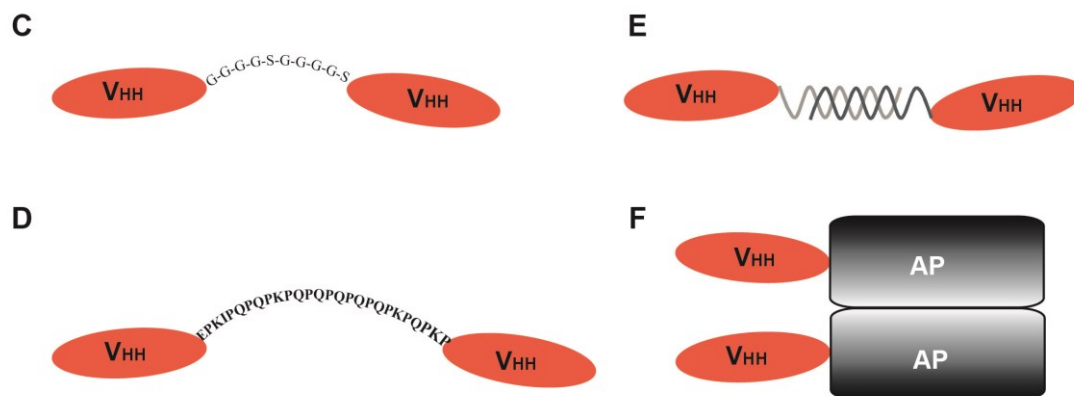


Abbildung 5: Bispezifität und Bivalenz. Bispezifität kann durch gentechnische Fusion von VHH-Domänen mit einem Albumin-bindenden Peptiden SA06 (A) oder einer VHH-Domänen AR1 (B) erzielt werden. Durch Kopplung zweier gleichartiger VHH-Domänen über Glycin-Serin-Linker (G4S)6 (C), Lamaantikörpergelenkregion-Linker (D), Doppelhelices (E) und alkalische Phosphatase (AP) (F) kann eine Bivalenz erreicht werden.

Bispezifität (Abb. 5 A und B) kann beispielsweise durch die kovalente Kopplung von VHH- Domänen an albuminbindende Peptide (Dennis et al. 2002) oder albuminerkennende VHHs (Coppieters et al. 2006) erzeugt werden. Dennis et al. (2002) entwickelten das albuminbindende Peptid SA06 mit der Aminosäuresequenz QRLMEDICLPRWGCLWEDDF. Ein Fab-Antikörper ($t_{1/2} = 1,28$ h) mit diesem Peptid erzielte eine Serumhalbwertszeit von 19,7 Stunden (Nguyen et al. 2006). Bei der Verwendung des albuminbindenden VHH-Antikörpers AR1 wurde ebenfalls die Serumhalbwertszeit von mehreren Minuten auf zwei Tage verlängert (Coppieters et al. 2006). Die Kopplung der kleinen VHH- Domänen an die ca. 66 kDa großen Albumine erhöht die Chance einer zielgerichteten Bindung der VHH, bevor sie über die Nieren ausgeschieden werden. Ist die bindende VHH- Domäne zur Detektion von bestimmten Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Interleukinen oder Akute-Phase-Proteinen, entwickelt worden, kann man sich einen weiteren Vorteil zu Nutze machen. Da Albumine

natürlicherweise am Entzündungsgeschehen teilnehmen, erreicht die an sie gekoppelte Bindungsdomäne schnell ihren Zielort. Albumin wirkt als endogenes Trägerprotein. Die Firma Ablynx hat bereits einen trivalenten *nanobody* entwickelt, bei dem die Bindung an Serumalbumin genutzt wird. Ozoralizumab ist ein anti-TNF α Antikörperkonjugat, welches bereits erfolgreich in Phase II Studien zur Rheumatherapie getestet wurde (Kratz und Elsadek 2012, Elsadek und Kratz 2012).

Durch Bivalenz ist eine erhöhte Avidität der funktionellen Einheit erreichbar. Sie kann durch kovalente Verbindung zweier identischer VHH-Domänen über unterschiedliche Linker (Glycin-Serin-Linker (Abb. 5 C) oder Antikörpergelenkregion (Abb. 5 D)) generiert werden. Außerdem kann Bivalenz durch die gentechnische Verknüpfung von synthetischen Helix-Schleife-Helix Strukturen (Doppelhelix, dhlx) und je einer VHH-Domäne erzielt werden (Abb. 5 E). Dabei kommen durch die Interaktion zweier Dhlx (Eisenberg et al. 1986) die funktionalen bindenden Einheiten in räumliche Nähe (Pack et al. 1992, Müller et al. 1998, Willuda et al. 2001, Kubetzko et al. 2006). Bei sogenannten *Ankyrin Repeat Proteins* (DARPin) werden diese Helices erfolgreich eingesetzt (Plückthun 2015). Bivalenz kann weiterhin durch die genetische Fusion einer VHH-Domäne an die Untereinheit eines Dimers, wie z.B. der alkalischen Phosphatase (AP) (Lindner et al. 1997, Habicht et al. 2007) oder eines Fc-Teils generiert werden (Foster et al. 2017). Da die AP und die Fc-Domäne funktional als Homodimer vorliegen, bilden auch die VHH-Domänen ein Fusionsdimer aus (Abb. 5 F).

1.7 Die VHH-Domäne B10 erkennt ausgereifte Amyloidfibrillen

Ein Beispiel für einen Antikörper, der seine Bivalenz durch die gentechnische Kopplung an eine alkalische Phosphatase erreicht, ist B10AP. Als funktionelle Einheit dient beim B10AP die VHH-Domäne B10, welche eingehend von Habicht et al. (2007) und Haupt et al. (2011a, 2011b) untersucht wurde.

B10 (Abb. 6) wurde aus einer vollsynthetischen, rekombinanten VHH-Bibliothek mithilfe von *phage display* selektiert. Dabei präsentieren replikationsfähige M13-Phagen eine spezifische VHH-Domäne auf der Oberfläche (Hoogenboom et al. 1998). Durch Selektion dieser Phagen gegen *in vitro* gebildete Amyloidfibrillen A β (1-40) konnte der B10-tragende Phage gebunden und anschließend amplifiziert werden. Nach drei Selektionszyklen konnte B10 periplasmatisch in *E.coli* exprimiert und über den C-terminalen His-Tag gereinigt werden. Die Expression in einer Hochzelllichtfermentation ermöglicht es, eine große Menge B10 für umfangreiche Analysen herzustellen.

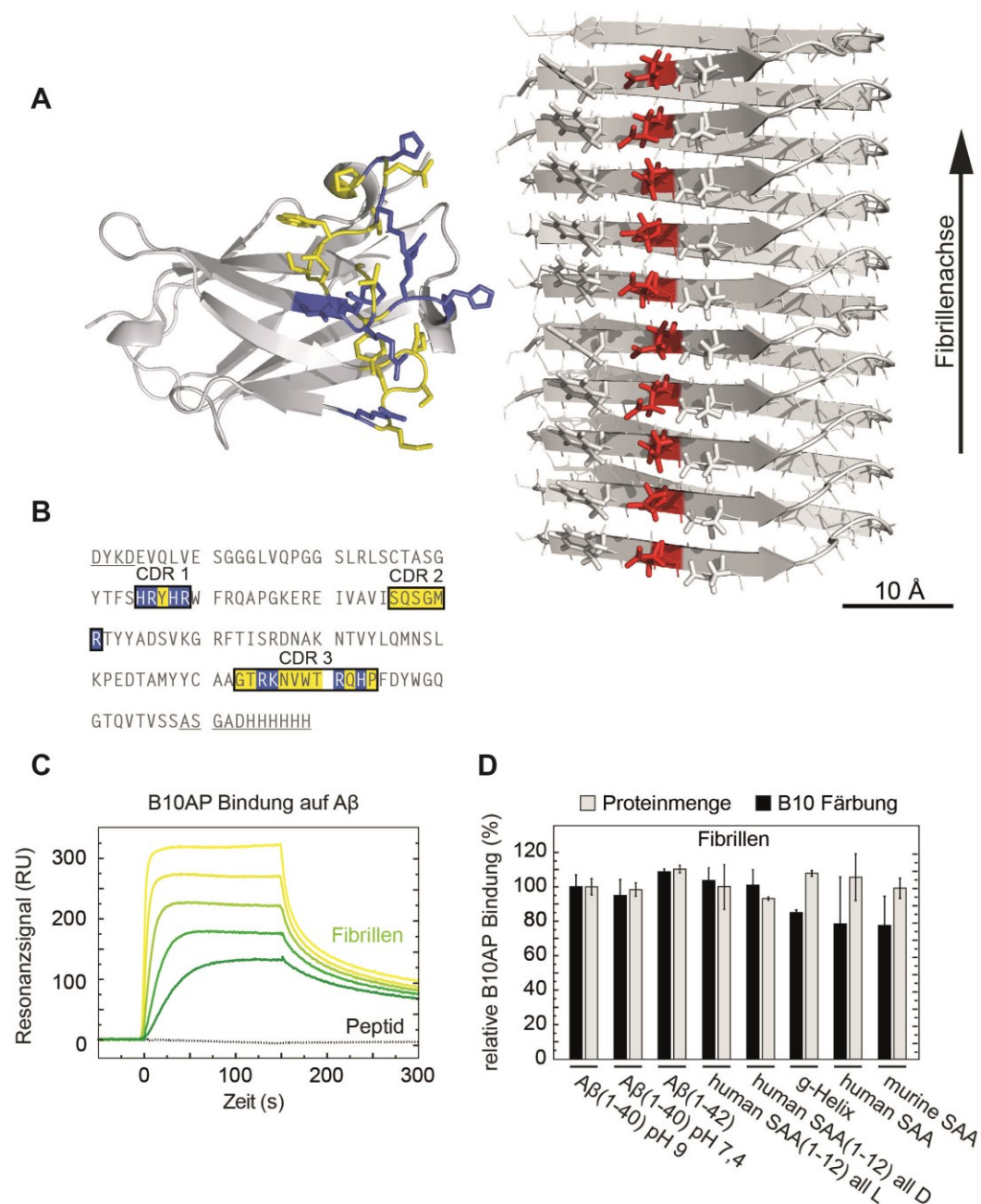


Abbildung 6: B10 und sein Bindungsverhalten an Amyloidfibrillen. (A). Das Paratop des B10 (Kristallstruktur PDB: 3LN9) besteht aus positiv (blau) und ungeladenen (gelb) Seitenketten. Eine Bindung an die negativen Seitenketten (rot) der Amyloidfibrille erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen. (B) Aminosäuresequenz des B10 mit positiv (blau) und ungeladenen (gelb) Aminosäuren innerhalb der CDR. Die unterstrichenen Aminosäuren gehören zu Tags, die nicht in der Kristallstruktur (A) zu sehen sind. (C) Der konformationsspezifische B10AP bindet in SPR Messungen Aβ(1-40) Fibrillen, aber kein Aβ(1-40) Peptid. (D) B10AP erkennt regelmäßige stark anionische Oberflächenmuster auf der Amyloidfibrille. Mithilfe von B10AP können im Spot Blot unterschiedliche Fibrillentypen detektiert werden (Habicht et al. 2007, Haupt et al. 2011a und b).

Die kompetitive Selektion der Phagen erfolgte mit einem zehnfachen Überschuss an disaggregiertem, d.h. nicht fibrillärem, A β (1-40)-Peptid. Damit wurde sichergestellt, dass die VHH-Domäne fibrillenspezifisch bindet. Mithilfe von Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) konnte gezeigt werden, dass Monomere (Abb. 6 C) und Oligomere des A β (1-40)-Peptids nicht gebunden werden. Für die konformationsspezifische Bindung von Fibrillen durch B10 konnte aufgrund der Auswertung von SPR Daten eine apparente Dissoziationskonstante (K_D) von 475 ± 4 nM und ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:10 (B10: A β) ermittelt werden. Durch die gentechnische Kopplung an das Homodimer der alkalischen Phosphatase von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde das Dimer B10AP generiert. Aufgrund seines bivalenten Charakters hat es eine, im Vergleich zum monovalenten B10, deutlich verbesserte Bindung an Amyloidfibrillen ($K_D = 7,22 \pm 0,97$ nM). Im Gegensatz zu den konventionellen Amyloidfibrillenbindern Serum Amyloid P ($K_D \approx 1$ μ M), Kongorot ($K_D \approx 0,1-1,6$ μ M) und Thioflavin T ($K_D \approx 0,5-2$ μ M) zeigt B10AP eine ca. 1000-fach stärkere Bindung. Die Fusion an die alkalische Phosphatase hat den zusätzlichen Effekt, dass B10AP direkt in Immunotests (Spot Blot, ELISA, Western Blot) detektiert werden kann. Der Einsatz von Sekundärantikörpern ist nicht notwendig. Durch Spot Blots konnte gezeigt werden, dass B10 ein Epitop auf verschiedenen Amyloidfibrillen, u.a. auch fibrilläres SAA, erkennt (Haupt et al. 2011a).

Laut elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist das B10-spezifische Epitop entlang der gesamten Fibrille, und nicht nur an deren Enden, vorhanden (Habicht et al. 2007). Weitere Untersuchungen zeigten, dass B10 keine amyloid- oder proteinspezifische Struktur erkennt, sondern stark regelmäßige und anionische Oberflächenmuster (Abb. 6 A) (Haupt et al. 2011a). Das bedeutet, dass B10 neben A β (1-40) Peptid- und AA- Fibrillen, auch Heparin und DNA erkennt (Abb. 6 D). Diese Bindung wird seitens der B10-Domäne durch positiv geladene Aminosäuren innerhalb des Paratops ermöglicht. Somit ist die Detektion einer Vielzahl von Amyloidfibrillen über deren hauptsächlich negativ geladenen Oberfläche möglich (Haupt et al. 2011b).

B10 wurde bereits auf Gewebeschnitten und 30 verschiedenen Biopsiestellen getestet. Dabei erkennt die VHH-Domäne B10 Amyloidplaques z.B. im Hypocampus von Alzheimer Patienten, in Leberbiopsien von Patienten mit systemischer Amyloidose, sowie in Zellkulturen (Habicht et al. 2007, Kieninger et al. 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der B10-Antikörper die Vorteile eines *nanobodies* (vgl. Kapitel 1.6.1) für die diagnostische Anwendung bei Amyloidosen nutzbar macht (Haupt und Fändrich 2014).

1.8 Zielstellung

Die systemische AA-Amyloidose tritt meist im Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, auf. Sie zeichnet sich durch fibrilläre Ablagerungen, bestehend aus N-terminalen Fragmenten des Akute-Phase-Proteins SAA, aus. Von den Ablagerungen sind v.a. Milz, Leber und Nieren betroffen. Um daraus resultierende erhebliche gesundheitliche Beeinträchtigungen wie eine Niereninsuffizienz zu vermeiden, muss eine entstehende systemische Amyloidose frühzeitig erkannt werden. Die konformationsspezifische Bindung der VHH-Domäne B10 an Amyloidfibrillen ist bereits sehr intensiv untersucht worden. Aufgrund seiner sehr guten Bindungseigenschaften soll B10 bei der Entwicklung eines Detektionssystems zur *in situ* Bildgebung der AA-Amyloidose eingesetzt werden. Diese Entwicklung sollte in vier Schritten erfolgen:

- (1) Herstellung neuartiger Antikörperformate basierend auf monovalentem B10 und bivalentem B10AP
- (2) Vergleichende *in vitro* Charakterisierung dieser Antikörper mit B10 und B10AP
- (3) Immunologische Wirkung der Antikörper in gesunden NMRI-Mäusen
- (4) Bildgebung der AA-Amyloidose mithilfe eines B10-Formats im PET/CT

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht in Tabelle 1 genannten Chemikalien wurden bei Merck oder Roth bestellt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Chloramin T	Sigma
Eisencitrat	Sigma-Aldrich
EZ-Link NHS-LC-Biotin (Linker 22,4 Å)	Life Technologies
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Serva
Jod-125	Perkin Elmer
Ketamin	Inresa
Ketamin Hydrochlorid/ Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat x 7H ₂ O	VWR
Mangan(II)chlorid	Sigma-Aldrich
PonceauS	Sigma-Aldrich
p-SCN-Bn-Deferoxamine	Macrocyclics (CAS-No.: 1222468-90-7)
Rompun® (Xylazin)	Bayer
Silbernitrat	Sigma-Aldrich
Uranylacetat	Plano (Wetzlar)
Zirkonium-89	PerkinElmer LAS (Germany) GmbH (NEZ308)

2.1.2 Plasmide und Zellen

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide und Zellen.

Plasmid/Zellen	Eigenschaft	Herkunft
p41B10mut6H	Expression von B10	Habicht et al. 2007
ptetB10mutpA6H	Expression von B10AP	Habicht et al. 2007
p41FEC	Geschwächter <i>lac</i> Promotor	Kraft et al. 2007
pHBFECU	verstärkter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	Kraft et al. 2007
pHBFEC	abgeschwächter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	Kraft et al. 2007
pHB110	Expression des Skp Chaperon	Bothmann & Plückthun 1998
pMA-T_GS-AB-6H	Synthese vom Albuminbindepeptid AB	GeneArt
pMA-T_MH-Dhlx-6H	Synthese der Doppelhelix Dhlx	GeneArt
pMA-T_UH-B10-6H	B10 mit alternativer <i>codon usage</i>	GeneArt
p41 B10B10	<i>lac</i> Promotor	diese Arbeit
pHBFECU B10AB	verstärkter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	diese Arbeit
pHBFEC B10B10AB	abgeschwächter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	diese Arbeit
pHBFEC B10Dhlx	abgeschwächter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	diese Arbeit
pHBFEC B10B10Dhlx	abgeschwächter <i>lac</i> Promotor und Skp Chaperon	diese Arbeit
RV308	<i>E. coli</i> Fermentationsstamm	Maurer et al. 1980
L-929	Mourine Fibroblasten	Sigma-Aldrich

2.1.3 Kulturmedien

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Medien und deren Zusammensetzung.

Medium	Zusammensetzung für 1 l
LB	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0
2xYT	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,0
M9	16 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O; 0,5 g NaCl; 3 g KH ₂ PO ₄ ; 10 ml Eisencitrat (6 g/l); 0,1 ml EDTA (84 g/l); 0,1 ml CoCl ₂ x 6 H ₂ O (2,5 g/l); 0,1 ml MnCl ₂ x 4 H ₂ O (15 g/l); 0,1 ml CuCl ₂ x 4 H ₂ O (15 g/l); 0,1 ml H ₃ BO ₃ (30 g/l); 0,1 ml Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O (25 g/l); 2 ml Zn(CH ₃ COO) ₂ x 2 H ₂ O (4 g/l); pH 7,0 nach Autoklavieren sterile Zugabe von 0,5 ml

Mineralsalz- medium für Fermentation	MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Stammlösung 1 M); 2 ml Glukose 50 % (w/v); 0,1 ml Thiamin (Stammlösung 10 mg/ml)
	1,28 g (NH ₄) ₂ HPO ₄ ; 5,33 g KH ₂ PO ₄ ; 0,68 g Zitronensäure, 10 ml Eisencitrat (6 g/l); 0,1 ml EDTA (84 g/l); 0,1 ml CoCl ₂ x 6 H ₂ O (25 g/l); 0,1 ml MnCl ₂ x 4 H ₂ O (150 g/l); 0,1 ml CuCl ₂ x 4 H ₂ O (12,3 g/l); 0,1 ml H ₃ BO ₃ (30 g/l); 0,1 ml Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O (25 g/l); 2 ml Zn(CH ₃ COO) ₂ x 2 H ₂ O (4 g/l); pH 4 - 5 nach Autoklavieren pH 7 und sterile Zugabe von 1,2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 1 ml Thiamin (Stammlösung 10 mg/ml), 28 g Glukose

2.1.4 Proteine, Enzyme und Antikörper

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Proteine und Enzyme.

Protein	Quelle	Hersteller
Aβ (1-40)	rekombinant	M. Fändrich (Uni Ulm)
Peptid p5	Chem. Synthese	JPT (Sequenz: Wall et al. 2011b)
Murines Serum Amyloid A (mSAA)	rekombinant	M. Fändrich (Uni Ulm)
Murines Serum Albumin	Mausserum	Sigma Aldrich
T4-DNA-Ligase	rekombinant	NEB
BsaBI	rekombinant	NEB
SacI	rekombinant	NEB
HindIII	rekombinant	NEB
SpeI	rekombinant	NEB
MluI	rekombinant	NEB
XbaI	rekombinant	NEB
ApaI	rekombinant	NEB
Anti-His ₆ -Peroxidase	Monoclonal/ Maus	Roche
Anti-Maus IgG-Peroxidase	Polyclonal/ Ziege	Merck
Anti-SAA Antikörper	Polyclonal/ Kaninchen	M. Fändrich (Uni Ulm)
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	Polyclonal/ Ziege	Sigma Aldrich

2.1.5 Kommerzielle Kits, gebrauchsfertige Lösungen, Standards

Tabelle 5: Kommerzielle Kits, gebrauchsfertige Lösungen und Standards.

Produkt	Hersteller
4 % Histofix	Roth
ExiTron nano 6000	Miltenyi Biotec
Gel Loading Dye, Blue (6x)	NEB
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific
Ilford Emulsion K5	Ilford über Plano

Metal Enhanced DAB Substrat	Thermo Scientific
Mouse SAA ELISA Kit	Tridelta Development Ltd
Novex Sharp Prestained Protein Marker	Life Technologies
NuPAGE LDS Sample Buffer (4 x)	Life Technologies
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20 x)	Life Technologies
NuPAGE Sample Reducing Agent (10 x)	Life Technologies
NuPAGE Transfer Buffer (20 x)	Life Technologies
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen
RPMI 1640	Life Technologies
YSI 2776 Glucose-Standard	YSI Life Sciences
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

2.1.6 Chromatographiesäulen

Tabelle 6: Säulen und Säulenmedium zur Verwendung in der FPLC.

Säulenmedium	Volumen	Hersteller	Säule	Hersteller
Ni-NTA Superflow	25 ml	Qiagen	XK 26/20	GE Healthcare
Talon	40 ml	Qiagen	XK 26/20	GE Healthcare
Q Sepharose FF	10 ml	Qiagen	XK 16/20	GE Healthcare
Mono Q 10/100 GL	8 ml	-	-	GE Healthcare
SP Sepharose FF	10 ml	Qiagen	XK 16/20	GE Healthcare
Mono S	1 ml	-	-	GE Healthcare

2.1.7 Geräte und Material

Tabelle 7: Geräte und Materialien.

Gerät	Hersteller
Äkta explorer	GE Healthcare
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten 30K Membran	Merck Millipore
Autostainer XL	Leica
Avanti Centrifuge J-25	Beckman Coulter
Axio Cam MRc5	Zeiss
Axioplan Mikroskop mit Polarisationsseinsatz	Zeiss
Biacore BC 2000	Ge Healthcare
BioPhotometer	Eppendorf

Blot Module XCell II	Life Technologies
Cellulose Nitrat Filter (1,2 µm)	Satorius
Chromatography Strips # 150-771	Tec-Control
Cyclone PhosphorImager	Packard Instrument Co.
Dialysekassette Slide-A-Lyser™ (3,5 K)	Life Technologies
Dialyseschlauch ZelluTrans 6,0 (8-10 K)	Roth
Elektrophoresekammer Mini-Sub cell GT	Biorad
Elektrophoresekammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Fermenter Biostat B-DCU 5 L	Sartorius
Gel Blotting Papier GB002 (0,4 mm)	Schleicher & Schuell BioScience
Hochdruckhomogenisator Emulsiflex C50	Avestin
IKA® Ultra Turrax®	Sigma Aldrich
Küvetten UVetten	Eppendorf
Massenspektrometer ultrafleXtreme	Bruker
Microtom	Leica
Minifold I Spot-Blotter	Schleicher & Schuell BioScience
Multiskan Spectrum	Thermo Scientific
NUNC MaxiSorp Mikrotiterplatte (F Bottom)	Thermo Scientific
Objektträger SuperFrost	Roth
pH-Elektrode SenTix 61	WTW GmbH
Pierce™ NeutrAvidin™ Coated Plates	Life Technologies
Reinstwasser-Anlage Milli-Q Advantage A10	Millipore
SA Sensor Chip	GE Healthcare
Scanner Epson Perfection 4180 Photo	Epson
Schüttelinkubator ISF-1-V	Adolf Kühner AG
Siemens Inveon Small Animal microPET/CT	Siemens Medical Solutions, Siemens Health-care Molecular Imaging, USA
Sonotrode VibraCell 75042	Bioblock Scientific
SPECT/CT Inveon Multimodality Instrument	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, USA
TEM JEM-1400 und Kamera CCD Orius SC 1000W	Jeol
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5424	Eppendorf
Transfermembran PROTRAN (Nitrocellulose; 0,1 µM)	Whatman

Transilluminator ChemiGenius ²	VWR International
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Xcell Blot Module	Invitrogen
YSI 7100 MBS	YSI Life Sciences

2.1.8 Computerprogramme

Tabelle 8: Verwendete Computerprogramme.

Program	Hersteller
Protparam	Expasy
Pymol	DeLano Scientific
TotalLab 100	Nonlinear Dynamics
RaptorX	Peng und Xu 2011a , 2011b
Siemens Inveon Research Workplace Software	Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, USA
Inveon Acquisition Software	IAW, Version 1.5.0.28; Siemens Medical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, USA
Unicorn 7.0 Control Software	GE Healthcare Life Science

2.1.9 Mäuse

Für die *in vivo* Versuche wurden 8 - 10 Wochen alte ausschließlich weibliche Naval Medical Research Institute (NMRI) Mäuse von Charles River verwendet. Die Tiere wurden in IVC Tecniplast Käfigsystemen mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Pelletfutter (Typ V1535, Ssniff Spezialdiäten GmbH) unter einem Lichtregime von 12 h Licht/ 12 h Dunkelheit gehalten. Die experimentellen Versuche wurden vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz in Bad Langensalza unter den Reg. Nr. 03-010/12 und 03-009/14 genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gentechnische Herstellung der B10-Formate

Alle VHH Konstrukte wurden ausgehend vom Plasmid p41B10mut6H hergestellt. Zu Beginn wurden die Plasmide p41B10B10, p41B10AB und p41B10Dhlx aus p41B10mut6H und den von GeneArt generierten Plasmiden (s. Tab. 2) über SacI bzw. BsaBI und HindIII hergestellt. Die Erstellung der Vektoren p41B10B10AB und p41B10B10Dhlx erfolgte erneute mit Hilfe der GeneArt Plasmide und dem

neu erstellten p41B10B10 durch enzymatischen Verdau mit SpeI und HindIII. Um die Löslichkeit einiger B10-Formate zu verbessern, wurde aus dem Vektor pHB110, welcher das Chaperon Skp trägt, und p41FEC, dessen *lac*-Operon durch Punktmutation leicht geschwächt wurde, unter Zuhilfenahme von MluI und HindIII der Vektor pHBFEC generiert. Die DNA der B10-Formate wurde anschließend aus den o.g. p41-Vektoren in pHBFEC (XbaI, HindIII) kloniert.

Für das Konstrukt B10AB wurde außerdem das Plasmid pHBFECU mit einem leicht verstärkten *lac*-Promotor verwendet. Die Klonierung des DNA-Fragments aus p41 in pHBFECU erfolgte über ApaI und HindIII.

Der enzymatische Verdau, die Isolierung der DNA aus dem präparativen Agarosegel, sowie die Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase erfolgten nach Herstellerangaben. Die Plasmide der positiven Klone wurden durch Sequenzierung überprüft.

2.2.2 Chemische Transformation

Die erstellten Plasmide wurden anschließend in *E.coli* RV308 transformiert. Dazu wurden chemisch kompetente Zellen nach folgendem Protokoll hergestellt.

Eine für 15 h in LB-Medium inkubierte *E.coli*- Kultur wurde mit frischem 2xYT Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nach 1,5 h bei 37 °C und 200 rpm wurden die Zellen 10 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und 20 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 600 µl CaCl₂-Lösung resuspendiert und für weitere 2 h inkubiert.

Für die Transformation wurden 3 µl Plasmid-DNA mit 50 µl der chemisch kompetenten Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 450 µl 2xYT- Medium zum Ansatz hinzugefügt. Die transformierten Zellen wurden 1 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert und anschließend auf einer LB-Agar Platte ausplattiert.

2.2.3 Kultivierung und Fermentation

Die Fed-Batch Fermentation von *E.coli* RV308 in M9-Medium erfolgte im 3 L Maßstab (Tab. 9). Glukose diente als alleinige Kohlenstoffquelle. Der Fermenter wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,2 beimpft und im Batch-Modus (pO₂ = 20 %; pH 6,7; 1 vvw) bis zum vollständigen Verbrauch der Start-Glukose betrieben. Danach erfolgte die Fermentation im Fed-Batch Betrieb, wobei die Dosierung von Glukose dem exponentiellen Wachstum der *E.coli* Kultur so angepasst wurde, dass ein Wachstumslimit erzeugt wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 60 wurde die Proteinexpression mithilfe von 1 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend wurde die Biomasse 20 min mit 12216 x g bei 4 °C zentrifugiert und

bei -20 °C gelagert. Die erfolgreiche Expression der VHH-Domänen wurde über eine SDS-Gelelektrophorese, sowie einen Western Blot nachgewiesen. Dabei wurde der lösliche und unlösliche Anteil der Proteine nach Ultraschallaufschluss analysiert.

Tabelle 9: Kultivierungsbedingungen der jeweiligen B10-Formate.

B10-Format	Temperatur	Chaperon Skp	Resistenz
B10	26 °C	Nein	β- Lactamase
B10AP	26 °C	Nein	Chloramphenicol – Acetyl- Transferase
B10B10	26 °C	Nein	β- Lactamase
B10AB	26 °C	Ja	Chloramphenicol – Acetyl- Transferase
B10B10AB	22 °C	Ja	Chloramphenicol – Acetyl- Transferase
B10Dhlx	26 °C	Ja	Chloramphenicol – Acetyl- Transferase
B10B10Dhlx	22 °C	ja	Chloramphenicol – Acetyl- Transferase

2.2.4 Reinigung der B10-Formate

Alle verwendeten Plasmide tragen neben den für die B10-Formate kodierenden Sequenzen zusätzlich eine *pelB*-Signalsequenz, die einen Transport der Proteine in das Periplasma der *E.coli*-Zellen bewirkt. Außerdem tragen die VHH-Antikörper einen C-terminalen His-tag, der zur Reinigung der B10-Formate genutzt wurde. Dazu wurden 100 g Zellpellet in 800 ml Resuspensionspuffer (IMAC Puffer A + 1,7 M NaCl) gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Emulsiflex C50 Homogenisator bei 1000 bis 1500 bar. Anschließend wurden 0,5 % Tween20 und 1 mM PMSF zu der Suspension gegeben, die in einem weiteren Schritt zentrifugiert wurde (Beckman JLA16.250, 90 min bei 4 °C mit 38400 x g). Der Überstand wurde durch eine 1,2 µm und 0,45 µm Membran filtriert.

Tabelle 10: Übersicht der für die Proteinreinigung über eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) und Ionenaustauschchromatographie (IEC) verwendeten Puffer und die angewendeten Gradienten Puffer B in % zur Elution der einzelnen Fraktionen. Alle Puffer wurden filtriert (0,22 µm).

	IMAC				IEC	
	Puffer A	Puffer B	Elution	Puffer A	Puffer B	Elution
B10	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8	5 % 40% 60% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl pH 8	30% 60% 100%

B10AP	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8	5% * 50% 100%	20 mM Tris pH 8	20 mM Tris 500 mM NaCl pH 8	40% 100%
B10B10	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8	25% 70% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl pH 8	20% 80% 100%
B10AB	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 6,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 6,5	10 % 80% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6,5	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl pH 6,5	30 % 80% 100%
B10B10AB	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 400 mM Imidazol pH 7,5	5 % 50% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,5	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl pH 7,5	10 % 80% 100%
B10Dhlx	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 400 mM Imidazol pH 7,5	30% 75% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,5	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl pH 7,5	80% 100%
B10B10Dhlx	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 400 mM Imidazol pH 7,5	10% 70% 100%	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,5	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl pH 7,5	50% 80% 100%

*nach der NiNTA wurde anschließend eine Talon Säule verwendet

Das Zelllysat der einzelnen VHH-Antikörper wurden zuerst mit Hilfe des Aufreinigungssystems ÄKTAexplorer 100 bzw. ÄKTApurifier 100 (GE Healthcare) über eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Für B10AP wurde dafür neben der NiNTA auch eine Talon-Säule verwendet. Anschließender wurden die Elutionsfraktionen 1:15 in Puffer A der IEC verdünnt, um die NaCl- Konzentration auf 20 mM zu minimieren, und über eine Ionenaustauschchromatographie (IEC) gereinigt (Tab. 10). Die Wahl des IEC-Säulenmaterials erfolgte je nach pI der verwendeten Proteine (SP Sepharose (Kationaustauscher) oder Q Sepharose (Anionenaustauscher)). Proben, die für die Tierversuche verwendet werden sollten, wurden zusätzlich über eine MonoQ-bzw. MonoS-Säule gereinigt. Dabei wurden ebenfalls die IEC-Puffer und Elutionsprofile genutzt (s. Tabelle 10). Um alle Proteine im gleichen Puffermedium zu lagern, wurde B10AP nach erfolgreicher

Reinigung gegen 20 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, pH 8 über Nacht bei 4°C mit dreimaligem Puffertausch dialysiert. Die Reinheit der Proben wurde über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Außerdem erfolgte eine Analyse des korrekten Molekulargewichts durch Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinproben wurde mithilfe eines NuPAGE MES-Puffersystems und NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gelen bei 180 mV für 45 min durchgeführt. Die Proben wurden durch Zugabe von NuPAGE-Probenpuffer und anschließender Inkubation bei 95 °C für 5 min denaturiert. Zusätzlich wurden reduzierende Bedingungen durch die Zugabe von NuPAGE-Reduktionsmittel zur Probe erzeugt. Novex Sharp Prestained Protein Marker wurde als Größenstandard mitgeführt. Nach erfolgreicher Elektrophorese wurden die Gele für 1 h in einer Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend 1 h in der Entfärbelösung inkubiert (Tab. 11). Die Konservierung der Gele erfolgte mit Hilfe von DryEase Mini Cellophane Folie in Konservierungslösung.

Tabelle 11: Verwendete Lösungen zum Färben und Konservieren von SDS-PAGE Gelen.

Lösung	Zusammensetzung für 1 L
Coomassie Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliantblau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Ethanol
Konservierungslösung	10 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) Ethanol

2.2.6 Western Blot

Für einen Western Blot wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel benötigt. Während der Gelelektrophorese wurden Filterpapier, Blotting Pads und Nitrocellulose-Membran bei RT in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Western BlotKammer wie folgt befüllt: 3-4 Blotting Pads, 1 Filterpapier, Gel, NC-Membran, 1 Filterpapier, 2-3 Blotting Pads und nach Einsetzen in die Xcell-Kammer mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte 60 min bei 30 V. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran eine Stunde in Blockinglösung und danach eine Stunde in einer 100 mU/ml anti-6xHis-HRP Antikörperlösung inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit Waschpuffer entfernt. Gebundene Antikörper wurden mit DAB Substrat so lange entwickelt bis eine optimale Farbintensität erreicht wurde.

Tabelle 12: Verwendete Lösungen im Western Blot

Lösung	Zusammensetzung für 1 L
Transferpuffer	1x NuPage Transfer Buffer, 10 % Methanol
Blockinglösung	2 % (w/v) bovines Albumin Fraktion V in TBS
Antikörperlösung	100 mU/ml Anti-6xHis-HRP in TBS
Waschpuffer (TBST)	20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Gill und Hippel

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption der Proben bei 280 nm in 6 M Guanidinhydrochlorid mit 20 mM Natriumphosphat pH 6,5 in UVetten (10 mm) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_M wurde entsprechend der Anzahl der Tyrosine, Tryptophane und Cysteine für jedes Protein berechnet (Glg. 1, Gill & Hippel 1989).

Gleichung 1: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_M eines Proteins

$$\epsilon_M = \text{Anzahl (Tyr)} \times 1280 + \text{Anzahl (Trp)} \times 5690 + \text{Anzahl (Cys)} \times 120$$

Die Konzentration der Proteinproben wurde anschließend nach Bestimmung der Absorption und Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_M mithilfe des Lambert-Beer Gesetzes (Glg. 2) berechnet.

Gleichung 2: Lambert- Beer Gesetz

$$E = \epsilon \times c \times d$$

2.2.8 LAL Test

Die Endotoxinbestimmung wurde auf einer ENDOSAFE®-PTS Kassetten mithilfe eines ENDOSAFE®-portable test system (PTS) Messgerät durchgeführt. Grundlage der Untersuchung ist eine Reaktion des Limulus Amebocyte Lysats (LAL) durch die Anwesenheit von bakteriellen Endotoxinen. Diese initialisieren eine Proteasekaskade im LAL, die zum Umsatz eines Substrats führt, wobei p-Nitroanilin gebildet wird. p-Nitroanilin kann anschließend photometrisch bei 385-410 nm gemessen werden. Dabei entsprechen 10 EU/ml nachgewiesenem Endotoxins 1 ng/ml.

2.2.9 Zytotoxizitätstest

Um den Einfluss von 50 (25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625) µg/ml B10AP auf murine Fibroblasten (L-929 (NCTC Klon), ViroMed Laboratories) einschätzen zu können, wurden die Zellen in RPMI 1614 Medium mit 10 % FBS und der Antikörper 72 h bei 37° C in einer feuchten Atmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Funktionsfähigkeit der Zellen mithilfe eines LDH Assays überprüft. Diese Arbeiten wurden von Dr. Hans-Martin Dahse (HKI) durchgeführt.

2.2.10 Chloroform-Methanol Proteinfällung

Innerhalb des Serumstabilitätstests von B10AP in Mausserum wurden die Proben vor dem Auftrag auf das SDS- Gel durch eine Chloroform-Methanol Fällung nach Wessel und Flügge (1984) von störenden Detergenzien und Salzen befreit.

Dazu wurden 100 µl Proteinlösung mit 400 µl Methanol versetzt und durchmischt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kurzer Durchmischung wurden 300 µl Wasser zum Ansatz hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe, nach weiterer guter Durchmischung, fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugieren (2 min, 9000 x g) kam es zu einer deutlichen Phasentrennung zwischen Chloroform und einer wässrigen Phase oberhalb der Interphase, die das denaturierte Protein beinhaltet. Die Oberphase wurde abgenommen und 300 µl Methanol zum verbleibenden Rest hinzugefügt. Die Mischung wurde geschüttelt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und fünf Minuten bei 9000 x g zentrifugiert. Das Protein wurde dadurch sedimentiert und der Überstand konnte entfernt werden. Anschließend wurde der SDS-Probenpuffer direkt auf das Protein gegeben.

2.2.11 Markierung der Antikörper mit Desferrioxamin

Die Funktionalisierung des Antikörpers erfolgte nach Walter et al. (2011) und Vosjan et al. (2010).

Eine konzentrierte B10-Lösung wurde über eine PD10 Säule in 0,9 % NaCl umgepuffert. Der pH wurde mithilfe von Na₂CO₃ auf einen Wert von 9 eingestellt. Zu dieser Antikörperlösung wurden 2 bzw. 10 Äquivalente Desferrioxamin-p-NCS (57 µg DFO-p-NCS in 15 ml DMSO) zugegeben und 40 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz über eine PD10 Säule entsalzt, über den Vakuumkonzentrator SpeedvacTM aufkonzentriert und massenspektrometrisch über eine MALDI-TOF-Messung auf den Derivatisierungsgehalt analysiert.

2.2.12 Test auf unspezifische Wechselwirkungen von B10AP im Hühnerei mittels PET/CT

Ga-68-Chlorid wurde mit 100 µl 1,1 M Natriumacetat gemischt und der pH der Lösung mit 2 M Natriumcarbonat auf einen Wert von 5 eingestellt. Anschließend wurden 200 µl des B10AP-Df Konjugats (0,89 mg/ml) dazugegeben und 5 min inkubiert. Zur Qualitätskontrolle der erfolgreichen Markierung wurde eine Dünnschichtchromatographie (ITLC) und Radio-HPLC durchgeführt.

Die Hühnereier wurden, wie bei Würbach et al. 2012 beschrieben, bearbeitet. In 16 und 17 Tage alten bebrüteten Eiern wurde die Chorion-Allantois-Membran durch eine 30 G Kanüle katheterisiert. Über diesen Zugang wurden 150 µl des B10 Antikörpers in das Ei injiziert. Während der PET/CT Messung wurden die Hühnerembryonen mit 5 % Isofluran anästhesiert. Die Untersuchungen im PET wurden in Triplikaten durchgeführt. Dabei wurde eine einstündige Messung in 51 Zeitrahmen (15 x 10, 10 x 25, 10 x 75, 10 x 125, 6 x 200 s) unterteilt. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Inveon Acquisition Software rekonstruiert. Die injizierte Aktivität konnte dabei über die ROI des gesamten Eis berechnet werden. Die microCT Messungen wurden mit einer Röntgenspannung von 80 kV durchgeführt. Der Röntgendetektor wurde mit four-by-four pixel binning Modus betrieben, wobei 201 Projektionen über eine 360° Drehung erfasst wurden. Die gesamte Röntgenexposition dauerte ca. zwei Minuten. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Gebhardt (HKI Jena) durchgeführt.

2.2.13 Immunogenität der Antikörper in Mäusen

Weiblichen NMRI Mäusen (Gruppen mit n = 4; 25-28 g) wurden an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 1 ,2 ,3) jeweils 3 nmol eines B10-Formats intravenös injiziert (Abb. 7). Die Gabe von PBS in weitere vier Tiere diente als Negativkontrolle. Diese Injektionen wurden nach zwei Wochen wiederholt (Tag 15 ,16 ,17). Vor der ersten Injektion, sowie anschließend wöchentlich (Tag 0, 7, 14, 21, 28), wurden durch Punktionen der lateralen Schwanzvenen Blutproben gewonnen. Zur Generierung von Präimmun- bzw. Immuns serum wurden die Blutproben über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend 15 min bei 4°C und 14.000 x g zentrifugiert (Steeland et al. 2015).

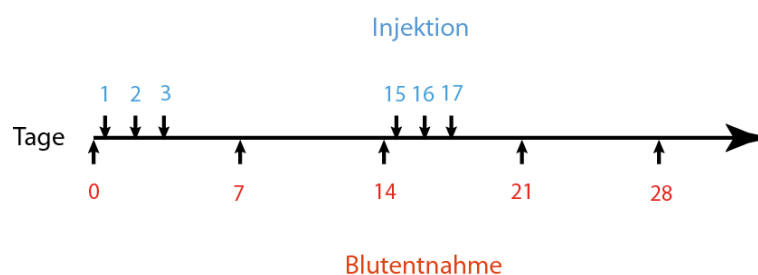


Abbildung 7: Zeitschema zur Testung der Immunogenität von B10-Formaten in Mäusen

Während des gesamten Tierversuches konnte ein normales Sozialverhalten der Mäuse beobachtet werden. Sie zeigten keine Anzeichen eines anaphylaktischen Schocks oder allgemeinen Unwohlseins (z.B. Lethargie, Gewichtsverlust, Separation von der Gruppe, ungepflegtes Fell).

2.2.14 ELISA zur Überprüfung der Immunogenität der Antikörper

Zur Untersuchung der gewonnenen Mausseren auf anti-B10-Format bzw. anti-p5 Antikörper wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurden stets in Doppelbestimmungen gearbeitet. Dazu wurden 100 µl einer 0,01 mg/ml B10 Antikörper- Lösung auf einer Maxisorp Platte über Nacht bei 4°C immobilisiert. Anschließend wurde die Platte dreimal 5 min mit PBST (0,05% Tween20) bei 220 rpm gewaschen. Mithilfe von 2% (w/v) BSA-Lösung wurden freie Bindungsstellen auf der Platte für zwei Stunden blockiert. Das gewonnene Mausserum wurde 1:50 in PBS verdünnt und anschließend für zwei Stunden auf der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach dreimal fünfminütigem Waschen mit PBST wurde der sekundäre Antikörper anti-Maus IgG-Peroxidase (1:200) auf die Platte gegeben. Gebundene Sekundärantikörper wurden mittels TMB bei 370 nm nach 10 min detektiert. Die Detektion von anti-p5 Antikörpern erfolgte analog mit biotinyliertem Peptid p5 auf NeutrAvidin-Platten laut Herstellerangaben ohne Verwendung von Blocklösung.

Tabelle 13: Verwendete Lösungen bei der Durchführung des ELISA

Lösung	Zusammensetzung
PBS	1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 8 g/L NaCl; 0,24 g/L KH ₂ PO ₄ ; 0,2 g/l KCl (pH 7,4)
PBST	1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 8 g/L NaCl; 0,24 g/L KH ₂ PO ₄ ; 0,2 g/l KCl (pH 7,4); 0,05 % (v/v) Tween20
Blockinglösung	2 % (w/v) bovines Albumin Fraktion V in TBS

2.2.15 Proteinstrukturvorhersage

Die Berechnung der 3D- Proteinstruktur erfolgte mithilfe des RaptorX Web servers (Källberg et al. 2012, Ma et al. 2013, Peng und Xu 2011a, Peng und Xu 2011b) und beruht auf der Aminosäuresequenz der Proteine. Der Algorithmus beruht auf Homologie mit in der PDB-Datenbank gespeicherten Molekülen. Als Referenzmoleküle wurden deshalb die B10-Domäne (PDB: 3LN9) und die Doppelhelix (PDB: 1QP6) verwendet.

2.2.16 Herstellung von Aβ (1-40)- und SAA-Amyloidfibrillen

Zur Herstellung nativer Aβ (1-40)- Fibrillen wurden 2 mg rekombinant hergestelltes Aβ (1-40) in 1 ml 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,4 gelöst. SAA-Amyloidfibrillen wurden durch lösen von 1 mg murinem SAA

in 100 µl Wasser und anschließender 1:10 Verdünnung mit 10 mM Tris pH 8,5 hergestellt. Anschließend wurde die Proteinkonzentrationen mittels der Methode nach Gill und Hippel durchgeführt. Reife Fibrillen konnten nach einwöchiger Inkubation bei 37°C elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Um Kontaminationen während der Inkubationsphase zu verhindern, wurde dem Ansatz 10 mM Natriumazid zugesetzt.

2.2.17 Spot Blot

Die Spot Blot Untersuchung wurde mit Hilfe einer Spot-Blot-Apparatur Minifold I Systems bei Raumtemperatur und in TBS bzw. TBST Puffer durchgeführt. Dabei wurden 2 µg Aβ (1-40)- bzw. SAA-Amyloidfibrillen in Dreifachbestimmung auf jeweils zwei Nitrocellulose Membranen (0,45 µm) gebロットet. Als Negativkontrolle diente TBS-Puffer. Eine Membran wurde anschließend 1 h in 2 % PonceauS-Färbelösung inkubiert, um den Transfererfolg auf die Membran zu bestätigen. Die zweite Membran wurde 1 h mit Blockinglösung inkubiert. Anschließend wurden 10 µg/ml des jeweiligen B10- Antikörpers in TBS für 1 h auf der Membran inkubiert und diese anschließend dreimal für 5 min in TBST gewaschen. Erfolgreich gebundene Antikörper wurden über den His-Tag mittels anti-His₆- Peroxidase (100 mU) detektiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für je 5 min wurde die Peroxidase mit Hilfe von DAB (Metal enhanced DAB) entwickelt. Die Intensitäten der dabei entstehenden Punkte auf der Membran wurden densitometrisch mit Fiji über die Bestimmung der Grauwerte ermittelt.

Tabelle 14: Verwendete Lösungen bei der Durchführung eines Spot Blots

Lösung	Zusammensetzung
TBS	20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl
TBST	20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20
PonceauS-Färbelösung	2 % (w/v) PonceauS, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
Blockinglösung	2 % (w/v) bovines Albumin Fraktion V in TBS

2.2.18 Biotinylierung von Aβ (1-40)-Fibrillen

Ein Ansatz bestehend aus EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin und Aβ (1-40) Fibrillen wurde in einem molaren Verhältnis von 1:100 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Biotinylierung erfolgte dabei in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,4. Nach der Inkubation wurde der Ansatz gegen PBS-Puffer in einer Dialysekassette bei 4°C über Nacht dialysiert. Die erfolgreiche Biotinylierung der Fibrillen wurde mithilfe eines Strep-AP im Spot Blot nachgewiesen.

2.2.19 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindungsstudien zur Ermittlung der K_D -Werte wurden an einem Biacore BC 2000 von Dr. Peter Hortschansky (HKI Jena) durchgeführt. Dazu wurden biotinylierte A β (1-40)-Fibrillen auf einem SA Sensor Chip immobilisiert. Flusszelle 1 blieb als Negativkontrolle ohne Fibrillen. Anschließend wurden die B10-Formate in 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,005 % (v/v) P20; pH 7,4 mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 L/min injiziert. Dabei wurden für B10 und B10AB die Konzentrationen 25; 50; 100; 200; 400; 800 nM und für B10AP, B10B10, B10Dhlx, B10B10AB und B10B10Dhlx die Konzentrationen 3; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 nM in Doppelbestimmung verwendet. Die Regeneration der Flusszellen wurde mit 50 mM NaOH, 1 M NaCl für 1 min durchgeführt. Die aK_D -Werte wurden über das 1:1 *steady state* Affinitätsmodell berechnet.

2.2.20 Präparation von Amyloid Enhancing Factor

Die Isolierung des *Amyloid Enhancing Factors* (AEF) aus murinen Milzen erfolgte in Anlehnung an Pras et al. 1968 und Skinner et al. 1982. Dazu wurden ca. 10 Milzen von Mäusen verwendet, die einen hohen Amyloidgehalt im Milzgewebe aufwiesen. Die Organe wurden in 30 ml 150 mM NaCl mit einem Ultra Turrax® homogenisiert und anschließend 30 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit weiterem 150 mM NaCl in einem Homogenisatorgefäß resuspendiert. Dieser Schritt des Zentrifugierens und Resuspendierens wurde sechsmal wiederholt. Danach wurde das Pellet in H₂O resuspendiert und 30 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde jedoch der amyloidhaltige Überstand verwendet. Diese Arbeiten wurden eigenständig unter Verwendung der Materialien und unter der Anleitung von Prof. Gunilla Westermark (BMC Uppsala, Schweden) durchgeführt (Lundmark et al. 2002).

2.2.21 Induktion der AA-Amyloidose im Mausmodell

Die AA-Amyloidose wurde in weiblichen NMRI Mäusen (25-28 g) induziert. Dazu wurden 100 µg *Amyloid Enhancing Factor* (AEF) intravenös als Aggregationskeim an Tag 0 injiziert. Eine subkutane Gabe von 200 µl 1%iger Silbernitratlösung diente als Entzündungsstimulus. Dieser Stimulus wurde wöchentlich (Tag 7 und 14) durch die Injektion von 100 µl 1%iger Silbernitratlösung wiederholt. Die Versuchsdauer betrug 16 Tage (Johan et al. 1998).

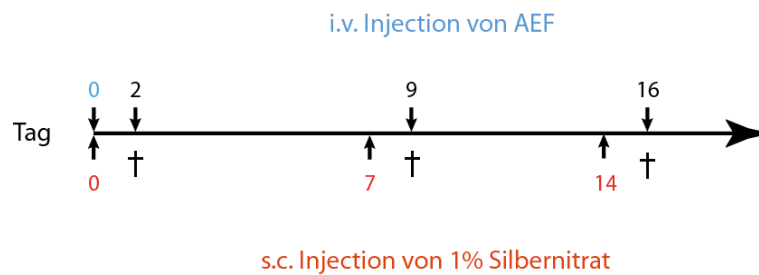


Abbildung 8: Zeitschema zur Induktion einer AA-Amyloidose in Mäusen. Die intravenöse (i.v.) Injektion von AEF erfolgte nur zu Beginn des Versuchs und die subkutane (s.c.) Injektion von Silbernitrat wöchentlich.

Während des Versuchszeitraumes stellte die engmaschige Erfassung klinischer Symptome (z.B. Gewicht, Fellzustand, Mobilität, Lethargie, Futter- und Wasseraufnahme, Auftreten von Hautulzerationen) in Kombination mit exakt definierten Kriterien zur Euthanasie (hochgradige Lethargie, deutlich eingeschränkte Mobilität, eingeschränkte Futter-/Wasseraufnahme, Gewichtsverlust $\geq 20\%$ gesamt oder $\geq 10\%$ in 24 Stunden) die Leidensminimierung der Versuchstiere sicher. Bei den Tieren wurde während der gesamten Versuchsdauer keine signifikante Reduktion des Körpergewichtes oder das Eintreten anderer Euthanasiekriterien festgestellt. Dies trifft auch für die Tiere zu, die eine starke Amyloidose entwickelt hatten. Nach jeder Silbernitratinjektion wurden Tiere zur Überprüfung der Amyloidoseninduktion mit einer Überdosis Ketamin/ Xylazin (200 μ l Ketamin (50 mg/ml)/ 50 μ l Xylazin (100 mg/ml)) narkotisiert. Durch Herzpunktion wurde Blutserum gewonnen und mit anschließender Dislokation der Halswirbel wurden die Tiere euthanasiert. Anschließend wurden die Mäuse einer Sektion unterzogen. Dabei wurden Milz, Leber und Nieren entnommen und in 4 % Formalin fixiert. Ein Leberlappen sowie ein Teil der Milz wurden für eine spätere AEF Isolierung bei -20°C eingefroren. Außerdem wurde Blutserum gewonnen und auf die Konzentration von SAA mittels ELISA Kit untersucht.

2.2.22 Organpräparation für die immunhistologische Untersuchung

Die bei der Sektion entnommenen Organe wurden für drei Tage in Histofix (4 % phosphatgepufferte Formaldehydlösung) fixiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gut gespült und je 2 h in 30 % (v/v) und 50 % (v/v) Ethanol inkubiert, bevor die Organe über 70 % (v/v), 90 % (v/v), absoluten Ethanol, Xylen und Paraffin entwässert wurden. Die präparierten Organe wurden in Paraffinblöcke gegossen und nach vollständiger Aushärtung mit einem Microtom in 6 bzw. 8 μ m dicke Schnitte geteilt. Vor jeder Färbung wurden die Proben mit Hilfe eines Autostainer XL entparaffiniert. Dazu durchlief die Probe folgende Inkubationsschritte:

-
- 2 x 10 min Xylen
 - 3 min absoluter Ethanol
 - 1 min absoluter Ethanol
 - 1 min 95 % (v/v) Ethanol
 - 1 min 70 % (v/v) Ethanol
 - 1 min 50 % (v/v) Ethanol
 - Wasser

2.2.23 Färbung histologischer Schnitte mittels Kongorot

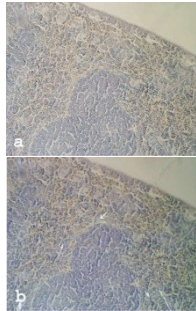

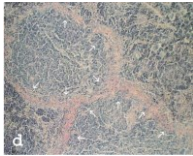
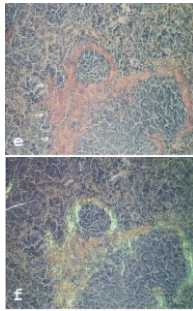
Die Kongorotfärbung zur Untersuchung der histologischen Schnitte auf Amyloidablagerungen erfolgte nach Puchtler et al. 1962. Dazu wurden 100 ml der beiden Stammlösungen (Tab. 15) durch einen Rundfilter filtriert und mit 1 ml 1% NaOH versetzt. Die Probenschnitte wurden nach dem Entparafinieren für 30 s in Hämatoxylin gegengefärbt und nach intensivem Waschen mit Leitungswasser je 20 min in Kongo A und Kongo B Arbeitslösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über absoluten Ethanol und Xylen entwässert und eingedeckt. Über ein Mikroskop mit integriertem Polarisationsfilter konnten die Organproben im Dunkelfeld auf ihren Amyloidgehalt überprüft werden.

Tabelle 15: Verwendete Lösungen für die Kongorotfärbung von histologischen Schnitten.

Lösung	Zusammensetzung für 1 L
Kongo A Stammlösung	30 g NaCl; 80 % (v/v) Ethanol
Kongo B Stammlösung	30 g NaCl; 80 % (v/v) Ethanol; 5 g Kongorot
Arbeitslösungen	Je 100 ml gefilterter Stocklösung 1 ml 1 % NaOH

Um den Grad der Amyloidablagerung mit der Literatur vergleichen zu können, wurde das Scoring System nach Lundmark für die Milz als Referenzorgan eingeführt (Lundmark et al., 2002).

Tabelle 16: Scoring System nach Lundmark et al. 2002 am Beispiel der Milz.

Amyloidose-grad	+1	+2	+3	+4
Beschreibung	Sehr geringe Ablagerung an den Follikel (a), nur mittels polarisierten Licht detektierbar (b)	Sichtbar ausgeprägte perifollikuläre Amyloidablagerungen in einigen Bereichen der Milz	Moderate Amyloidablagerungen um die meisten bzw. alle Follikel	Starke Amyloidablagerungen um die Follikel
Bsp. Milz				

2.2.24 Immunhistologische Färbung zum Nachweis von murinem SAA im Gewebe

Zum spezifischen Nachweis von murinem SAA in Gewebeschnitten wurden entparaffinierte Schnitte 10 min in 3 % Wasserstoffperoxid inkubiert und anschließend 30 min bei 90 °C in 20 mM Citratpuffer pH 6 aufgekocht. Nach einem 10 minütigen Absättigen freier Bindungsstellen mit 10% iger Albuminlösung wurde der 1: 200 verdünnte anti-SAA Antikörper (aufgereinigter polyklonaler Antikörper aus Ulm) über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden nach intensivem Waschen durch einen anti-rabbit IgG -HRP Antikörper (1:100) spezifisch nachgewiesen. Zur besseren Übersicht auf den Schnitten wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 30 Sekunden durchgeführt. Zur Überprüfung der korrekten Färbetechnik wurden auf einem Objektträger jeweils drei Organschnitte aufgebracht. Ein Schnitt wurde auf die oben beschriebene Weise gefärbt, während die anderen beiden Schnitte als Negativkontrollen für unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers, sowie für nicht geblockte native murine Peroxidase dienten.

2.2.25 Markierung von B10B10-DFO mit Zirkonium-89

100 µl der gelieferten Zirkonium-89-Lösung wurden mit 100 µl einer 0,1 M Na₂CO₃ Lösung und 50 µl einer 0,25 M Ammoniumacetatlösung versetzt. Dieser Ansatz wurde zu 500 µl der bereits hergestellten 2,1 mg/ml B10B10-DFO Lösung (siehe 2.2.11) hinzugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine 10 kDa Membran filtriert und eingeeengt. Das Produkt

wurde mit 250 µl 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend erneut filtriert. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Der Erfolg der Markierung wurde mithilfe von Affinitätschromatographie Streifen überprüft. Die Markierung wurde von Dr. Björn Gebser und Michel Pfeifer-Leeg (HKI Jena) durchgeführt.

2.2.26 PET/CT mit Mäusen

Die Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie zur ^{89}Zr - B10B10 Bildgebung wurde mit dem multimodalen Siemens Inveon Kleintier PET/CT-System durchgeführt. In diesem System sind zwei unabhängig arbeitende PET und CT Scanner kombiniert. Die PET-Messungen wurden mit einem Koinzidenz-Zeitfenster von 3,4 ns und einem Energie-Fenster von 350 bis 650 keV durchgeführt. Die Daten wurden über 45 Minuten mit aufgenommen, beginnend zwei Stunden nach Injektion des radioaktiven Antikörpers. Die Bilder wurden mithilfe des OSEM3D/MAP Rekonstruktionsalgorithmus in 3D rekonstruiert. Dabei wurde eine Auflösung von 1,202 mm erreicht. Das CT Modul besteht aus einer Kegelröntgenstrahl μCT Quelle (50-µm Brennfleckgröße) und einem $3072 \times 2,048$ -pixel Röntgendetektor. Für das sechs minütige SchwächungsCT wurden folgende Parameter eingestellt: eine axial-transaxial Auflösung von 2048×3072 pixel, eine Spannung von 80 kV bei 500 µA, 220° kontinuierliche Rotation und 120 Projektionen pro Aufnahmeposition, zwei überlappende Aufnahmepositionen, 260 (beim ersten Versuch) bzw. 300 ms (beim zweiten Versuch) Belichtungszeit im Ganzkörper-Schwächungsscan. Die CT-Aufnahmen wurden mithilfe eines Shepp-Logan Filters und Kegelstrahlrückprojektion rekonstruiert. Dabei wurden eine bilineare Interpolation und eine niedrige Rauschminderung verwendet. Die PET/CT Aufnahmen, sowie deren Verarbeitung wurde von Bianca Hoffmann (HKI Jena) mit der Siemens Inveon Research Workplace Software durchgeführt.

2.2.27 Nachweis des B10B10 Antikörpers im AA-Amyloidose-Mausmodell

Nach Induktion der AA-Amyloidose wurden den Mäusen rund 4,2 MBq des radiomarkierten B10B10 Konstrukts injiziert. Als Kontrolle erhielten pro Zeitpunkt jeweils zwei Mäuse ohne induzierte Amyloidose eine vergleichbare Injektion mit radiomarkiertem VHH-Antikörper. Um zu analysieren, wie schnell die Radiosonde Zugang zum Zielantigen findet, wurden mit Isofluran-narkotisierte Mäuse nach 2 h, 24 h und 48 h mit einem Inveon PET/CT-System nach einem etablierten Protokoll untersucht. Dabei wurden rund sechs Minuten lang ein CT und rund 45 Minuten ein PET gemessen. Zur besseren Darstellung von Milz und Leber wurden in einem Teilversuch vor der Messung 100 µl des Kontrastmittels ExiTron nano 6000 i.v. in alle zu untersuchenden Mäuse injiziert. Mithilfe der PET/CT-Messungen sollten außerdem die radioaktiven Belastungen der Organe (Leber, Milz und Nieren) abgeschätzt werden. Anschließend wurde nach 2 h, 24 h, und 48 h von jeder Maus eine Blut-

probe entnommen, um deren Radioaktivität zu messen. Diese Proben sollten helfen, eine Aussage über die Serumhalbwertszeit des B10B10-Formats treffen zu können. Um zu untersuchen, ob das Signal der Radiosonden mit den beobachteten PET/CT-Mustern korreliert, wurden die Mäuse nach den vorgesehenen Messungen durch eine Überdosis Ketamin/Xylazin unter Isofluran-Narkose euthanasiert. Nach vollständigem Entbluten durch eine Herzpunktion wurden die Organe entnommen, gewichtsnormalisiert und deren spezifische Radioaktivität mittels Bohrlochbestimmung gemessen. Zur weiteren Verwendung wurde ein Teil der Organe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und der restliche Anteil für die Kryohistologie vorbereitet. Von diesen Präparaten wurden serielle histologische Schnitte angefertigt. Für den Nachweis von Amyloidablagerungen wurden alle Organschnitte mit Kongorot gefärbt und nach Abklingen der Probe am Polarisationsmikroskop analysiert. Das SAA-Protein wurde in Paraffinschnitten immunhistochemisch mit einem α -Maus-SAA-Antikörper nachgewiesen. Um eine Kolokalisation von dem Antikörper und den Fibrillen in Kryoschnitten vorzunehmen, wurde in den Schnitten ebenfalls B10B10 durch Autoradiographie nachgewiesen. Da die Expositionsdauer bei der Autoradiographie abgeschätzt werden musste, wurden mehrere Schnitte der einzelnen Organe angefertigt und mit Ilford Emulsion K5 inkubiert. Die Entwicklung dieser Emulsion wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen. Abschließend sollten aus den PET/CT-Datensätzen dreidimensionale Rekonstruktionen (Oberflächendarstellung) erstellt werden, die Aussagen über die Qualität der Amyloidbelastung im Organismus liefern.

2.2.28 Autoradiographie

Die Detektion der radioaktiv markierten Antikörper im Mausgewebe erfolgte in einem speziellen Radiolabor mit Dunkelkammer durch die *thaw-mounting* Methode mithilfe der Ilford Emulsion K5.

Dazu wurde die Emulsion zu drei Teilen mit zwei Teilen destilliertem Wasser bei 42-44°C verdünnt. Für eine Versuchsreihe wurden 84 SuperFrost-Objektträger, durch langsames eintauchen und wieder herausnehmen aus dem Behälter, mit der vorbereiteten Emulsion bedeckt. Überschüssige Emulsion wurde mit Zellstoff entfernt. Die Emulsion auf den Objektträgern wurde langsam getrocknet und anschließend in einer lichtundurchlässigen Box gelagert. Die im Kryostat geschnittenen Organproben (Milz und Leber) konnten nun in Dunkelheit durch antauen der Probe auf die emulsionsbeschichteten Objektträger übertragen werden. Die so bedeckten Proben wurden bei -20°C gelagert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten entwickelt, um eine optimale Expositionsdauer für die Organschnitte zu ermitteln. Die Entwicklung der Proben erfolgte 4 min bei 20°C mit Ilford Phenisol (1:5 verdünnt). Nach kurzem Spülen der Proben mit destilliertem Wasser wurden die Silber-Präzipitate mit Ilford Hypam (1:5 verdünnt) für 5-10 min fixiert und verbliebene Silberhalogenide entfernt. Anschließend

wurden die Proben 15-30 min mit Leitungswasser gespült, um durch die Fixierung gebildete Silberthiosulfate zu entfernen, und mit Hämatoxylin und Kongorot (s. 2.2.23) gefärbt.

2.2.29 ¹²⁵I -Markierung von VHH-Antikörpern

B10 und B10B10 wurden wie in Wall et al. (2006) beschrieben mit I-125 über Tyrosinseitenketten markiert. Dazu wurden 50 µg des jeweiligen Antikörpers in Phosphatpuffer pH 7,6 mit ca. 74 MBq I-125 und 20 µg Chloramin T versetzt. Die radiomarkierten Proben wurden über eine Gelfiltration mit AcA34 Medium und 0,1 % Gelantine in PBS als mobiler Phase gereinigt und von ungebundenem Jod getrennt. Anschließend wurden die radiomarkierten VHH-Antikörper mittels SDS-PAGE auf ihr korrektes Größenverhältnis getestet. Zur Auswertung wurde Cyclone Phosphorimager verwendet. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Prof. Jonathan S. Wall, Dr. Stephen J. Kennel und Dr. Angela Williams (Department of Medicine, University of Tennessee Graduate School of Medicine, Knoxville, Tennessee, USA) durchgeführt.

2.2.30 Bindung von Amyloidfibrillen durch ¹²⁵I-markierte VHH-Antikörper

Zur Überprüfung der funktionalen Bindung von ¹²⁵I- B10 und ¹²⁵I-B10B10 an Amyloidfibrillen wurde ein „pull-down Assay“ (Kennel et al. 2016) durchgeführt. Dazu wurden 50 µg *in vitro* Aβ(1-40)-Fibrillen in 200 µl PBS mit 0,1 % Tween 20 suspendiert und mit 10 µl des radioaktiven Antikörpers (ca. 5 ng, ca. 50000 cpm) versetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde rotierend gemischt. Durch zehnminütige Zentrifugation des Ansatzes bei 13000 x g wurden die Fibrillen sedimentiert und von nichtgebundenen Antikörper getrennt. Das Pellet wurde resuspendiert, gewaschen und die Radioaktivität mittels Wizzard 1480 Gamma Szintillatorzähler gemessen. Der gebundene prozentuale Anteil wurde, wie in Gleichung 3 beschrieben, errechnet. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Prof. Jonathan S. Wall, Dr. Stephen J. Kennel und Dr. Angela Williams (Department of Medicine, University of Tennessee Graduate School of Medicine, Knoxville, Tennessee, USA) durchgeführt.

Gleichung 3: Berechnung des prozentualen Anteils Fibrillen gebundener Antikörper in „pull-down Assay“

$$\text{gebundener Anteil \%} = \frac{\text{Aktivität Pellet}}{\text{Aktivität Pellet} + \text{Aktivität Überstand}} \times 100$$

2.2.31 SPECT/CT von VHH-Antikörpern in huIL-6-Mausmodell

In ca. acht Wochen alte transgene huIL-6 Mäuse wurden 10 µg AEF in 100 µl PBS ca. fünf Wochen vor Versuchsstart i.v. injiziert. Zu Beginn des Versuchs wurden ca. 5 µg des entsprechenden Antikörpers mit ca. 3,3 MBq in 200 µl injiziert. Vier, 24 und 48 Stunde nach der Injektion wurden je drei

Tiere getötet und mit SPECT/CT (Inveon Multimodalitätsinstrument) vermessen. Die Aufnahmen wurden, wie in Wall et al. (2013) beschrieben, rekonstruiert und ausgewertet. Nach der Messung wurden die Tiere seziert und elf Organe/Gewebe entnommen. Für die Bestimmung der Verteilung der Antikörper wurde die Radioaktivität der Organe bestimmt und anschließend wurden diese in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und in 6 µm dicke Teile geschnitten. Die Organschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin und Kongorot gefärbt, sowie mittels Autoradiographie histologisch untersucht (Wall et al. 2013). Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Prof. Jonathan S. Wall, Dr. Stephen J. Kennel und Dr. Angela Williams (Department of Medicine, University of Tennessee Graduate School of Medicine, Knoxville, Tennessee, USA) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *in situ* Bildgebungsverfahrens basierend auf der VHH-Domäne B10. Dazu sollten der bereits sehr gut charakterisierte B10AP (s.1.7.) und verschiedene neuartige, von B10 abgeleitete Konstrukte auf ihre Eignung als Detektionsmarker untersucht werden. Zur Untersuchung eines geeigneten B10-Antikörpers in der Bildgebung mittels PET/CT wurde das Silbernitrat-induzierte AA-Amyloidose-Mausmodell (Johan et al. 1998) etabliert und verwendet.

3.1 B10AP eignet sich als diagnostisches Agens im murinen Tiermodell

Zu Beginn der Arbeit wurde B10AP auf seine Tauglichkeit als Detektionsmarker getestet. Dazu wurde der Antikörper rekombinant in *E. coli* hergestellt und gemäß Habicht et al. 2007 gereinigt. Anschließend wurden *in vitro* und *in vivo* Versuche durchgeführt, um B10AP für die Anwendung in der Maus zu testen. Dazu gehörten die Bestimmung des Endotoxingehalts der Proteinprobe und die Zelltoxizität, die Serumstabilität, sowie Tests auf unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers.

3.1.1 B10AP ist nicht toxisch

Wird ein pharmazeutisches Produkt im Organismus getestet, ist der Endotoxingehalt der zu injizierenden Probe von großem Interesse. Aufgrund der biotechnologischen Herstellung von B10AP in *E. coli* ist es möglich, dass der Antikörper Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide) beinhaltet, die in Säugetieren eine sehr starke Immunantwort mit Fieber hervorrufen. Um die Konzentration der Endotoxine in einer 0,82 mg/ml B10AP-Probe zu bestimmen, wurde ein kommerziell erhältlicher Limulus-Amöbozyten-Lysat-(LAL)-Test durchgeführt (s. 2.2.8). Der Test ergab einen Wert von 0,49 EU/ml (EU = Endotoxine Units), was einem Wert von 0,049 ng Endotoxin/ml entspricht (Malyala et al. 2008). Da der VHH-Antikörper im PET/CT als radioaktiv markierter Binder eingesetzt werden soll, wurde der Grenzwert für intravenös applizierte Radiopharmazeutika von 175 EU (Malyala et al. 2008) angesetzt. Damit liegt der gemessene Wert deutlich unter dem gesetzlich vorgegebenen Maximalwert.

Nachdem relevante Endotoxinmengen in der Probe ausgeschlossen werden konnten, wurde untersucht, ob B10AP einen toxischen Effekt auf murine Zellen hat. Dieser Test wurde von Dr. Hans-Martin Dahse (HKI Jena) durchgeführt. Dazu wurden murine Fibroblasten (Zelllinie L-929) verwendet, da

diese Zellen zur Überprüfung der Zelltoxizität von Medizinprodukten gemäß ISO 10993 genutzt werden.

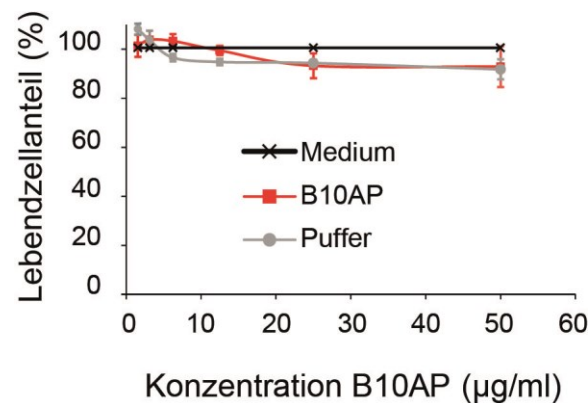


Abbildung 9: Zytotoxizität von B10AP auf murine Fibroblasten (L-929). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von B10AP für drei Tage inkubiert. Danach wurde ein LDH-Test durchgeführt (n=4, Mittelwert \pm Standardabweichung), um den Anteil lebender Zellen zu bestimmen. Dazu wurde der je nach entsprechender B10AP-Konzentration verdünnte Phosphatpuffer als Negativkontrolle (grau), sowie das Kultivierungsmedium RPMI 1614 ohne B10AP als 100 % Referenz (n=1, schwarze Linie) mitgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass B10AP (rot) keine toxische Wirkung auf murine Zellen hat.

Die nicht vollständig differenzierten Fibroblasten wurden in RPMI 1614 Medium mit 10 % FBS kultiviert (Abb. 9). B10AP wurde mit einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt und seriell verdünnt. Der Antikörper wurde drei Tage mit den Zellen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Zustand der Zellen mit einem LDH-Assay analysiert. Wird die Zellmembran der Fibroblasten zerstört, tritt das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ins Zellkulturmedium aus und kann detektiert werden. Die Aktivität der LDH wird indirekt über den Substratumsatz von Iodonitrotetrazolium zu Formazan nachgewiesen, welches bei 490 nm absorbiert. Zur verbesserten Darstellung wird im Diagramm der Anteil der lebenden Zellen dargestellt. Es konnte ab einer Konzentration von 25 µg/ml B10AP ein leichter Abfall des Anteils lebender Zellen auf ca. 95 % beobachtet werden. Jedoch ist ein ähnlich starker Abfall durch den Einsatz von Puffer ohne B10AP nachgewiesen worden. Das bedeutet, dass kein toxischer Effekt der Antikörperprobe auf die getesteten Mauszellen beobachtet wurde.

3.1.2 B10AP ist stabil im Mausserum

Da der B10AP in folgenden Experimenten im Mausmodell eingesetzt werden sollte, wurde zuvor seine Stabilität in Mausserum, welches von gesunden Tieren entnommen wurde, getestet. Dazu wurde B10AP drei Tage im Serum bei 37°C inkubiert. Ein Ansatz ohne Serum diente als Referenz. Danach wurde der inkubierte B10AP mit einem Spot Blot gegen Amyloidfibrillen auf seine Bindungsfunktionalität getestet (Abb. 10 A). Dazu wurden A β (1-40)-Fibrillen auf einer Nitrozellulosemembran immo-

bilisiert. Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass B10AP nach der Inkubation in murinem Serum weiterhin Amyloidfibrillen detektiert. Die Bindung wurde direkt durch den Substratumsatz der alkalischen Phosphatase des B10AP nachgewiesen. Mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot wurde der B10AP auf seine strukturelle Stabilität nach der Inkubation im Blutserum getestet (Abb. 10 B). Dazu wurden diese Proben mittels Chloroform und Methanol (Wessel und Flügge 1984) gefällt, um störende Salze und Detergenzien zu entfernen und anschließend auf ein Proteingel aufgetragen. Der Vergleich der Bandenmuster der Proben mit und ohne Mausserum zeigte, dass nach dreitägiger Inkubation keine Veränderung des B10AP zu beobachten war. B10AP wurde folglich nicht proteolytisch abgebaut. Kleinere Änderungen in der Bandenintensität und -höhe sind auf die im Serum enthaltenen zusätzlichen Stoffe (z.B. Lipide) und die damit verbundene leicht veränderte Laufeigenschaften in der SDS-PAGE zu erklären.

Die Inkubation des VHH-Antikörpers B10AP in murinem Serum führte zu keinen funktionellen und strukturellen Beeinträchtigungen des Antikörpers.

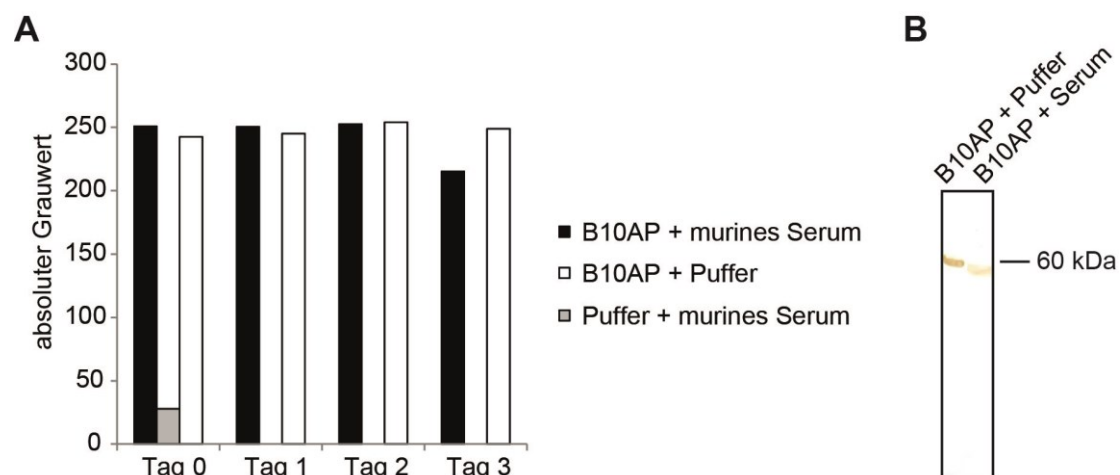


Abbildung 10: B10AP ist funktional nach Inkubation in Mausserum. (A) Nach einer dreitägigen Inkubation von B10AP in Mausserum gesunder Tiere ist mittels Spot Blot eine positive Bindung von B10AP an immobilisierten A β (1-40)-Fibrillen nachweisbar ($n = 2$). (B) Mithilfe eines Western Blots konnte gezeigt werden, dass B10AP während der Inkubation in Mausserum nicht gespalten oder abgebaut wird. Es sind keine veränderten Bandenmuster für B10AP nach Inkubation in Mausserum, im Vergleich zu der Probe ohne Inkubation in Mausserum, zu erkennen.

3.1.3 Es konnte keine unspezifische Bindung von B10AP *ex vivo* oder *in vivo* beobachtet werden

In weiteren Experimenten wurden unspezifische Wechselwirkungen von B10AP mit Zellmaterial von Leber, Niere, Milz und Herz von C57BL/6 Mäusen ausgeschlossen. Für diese Untersuchung wurde zunächst *ex vivo* mit Organen gesunder Tiere gearbeitet. Dazu wurden die Organe mithilfe eines Ultra-Turrax® homogenisiert und anschließend die festen Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert.

Der lösliche Überstand wurde auf einer Nitrozellulosemembran im Spot Blot immobilisiert. Anschließend wurde das immobilisierte Material mit 0,5 µg/ml B10AP inkubiert. Durch den Substratumsatz der alkalischen Phosphatase (AP) konnten direkt Wechselwirkungen zwischen B10AP und dem Homogenisat detektiert werden. Es wurden dabei keine Bindungen von B10AP an lösliche Organbestandteile von Herz, Leber, Milz und Nieren beobachtet, die mit der Bindung an Amyloidfibrillen vergleichbar sind (Abb. 11 C).

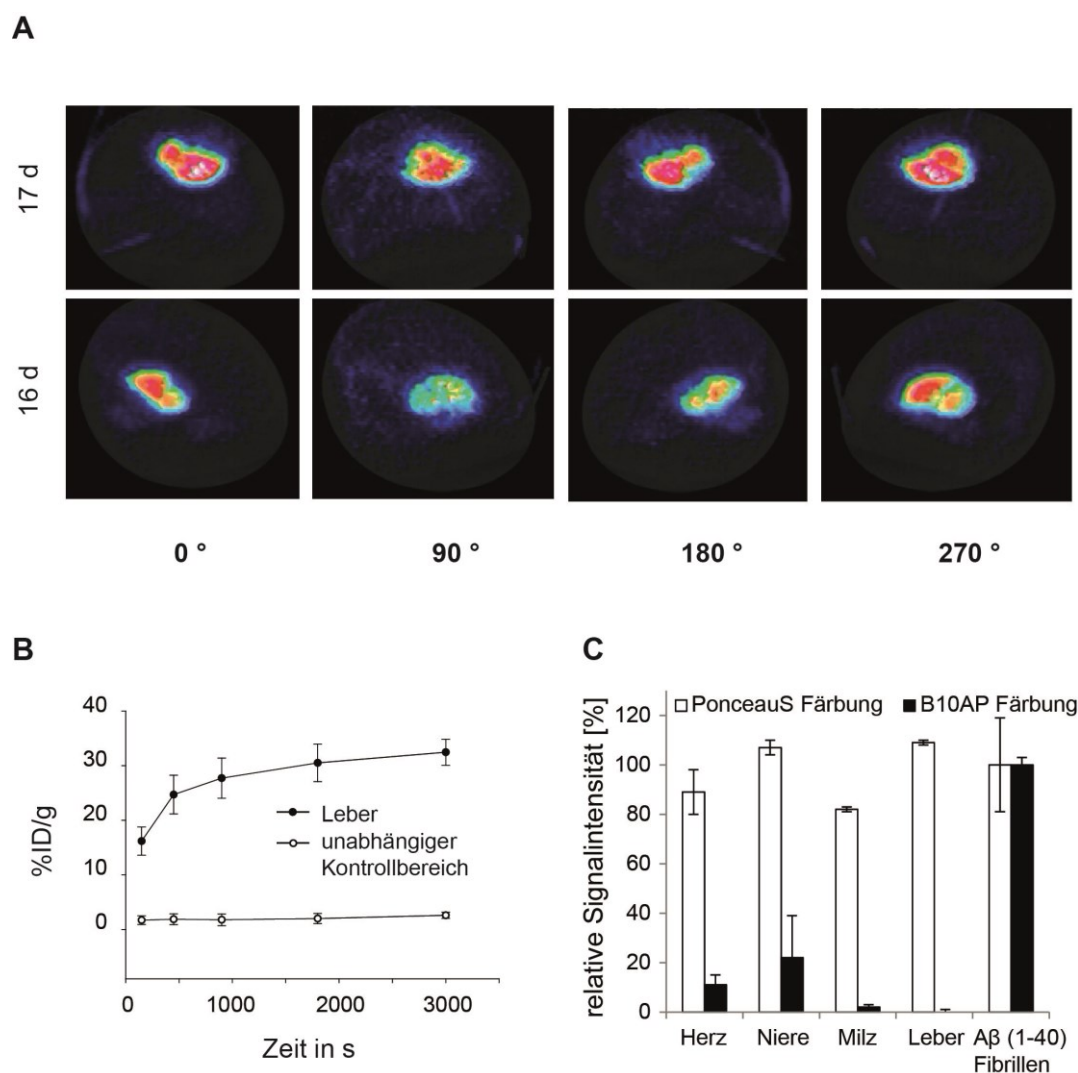


Abbildung 11: B10AP bindet keine unspezifischen Epitope im Hühnerembryo-Modell (A und B) und in Mausorgan-Suspensionen (C). Dazu wurde B10AP mit Ga68 markiert und intravaskular in ein 16 bzw. 17 Tage bebrütetes Hühnerei injiziert. Die PET/CT Messung erfolgte sofort nach Injektion. In einer nach der Messung berechneten Animation aus PET und CT Daten konnten die Hühnereier in einer räumlichen 360° Ansicht ausgewertet werden. In (A) sind Ausschnitte dieser räumlichen Darstellung gezeigt. Außerdem wurden Einzelmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Leber und einem unabhängigen Kontrollbereich durchgeführt (B). Es wurden keine Wechselwirkungen von B10AP mit löslichen Organbestandteilen von gesunden Mäusen beobachtet werden (C). Dazu wurden die genannten Organe homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand, eine Suspension bestehend aus löslichen Organanteilen und Gewebefragmenten, wurde auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und anschließend mit B10AP inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 2$.

In einem weiteren Experiment wurden *in vivo* die potentiellen Wechselwirkungen von B10AP mit Organgeweben untersucht werden. Versuche im Hühnerei gelten nicht als Tierversuch (Price et al. 1986), trotzdem ist das Hühnerei ein anerkanntes Modell und zeigt in einigen Forschungsbereichen (z.B. Tumorforschung und Pharmakokinetik) gleiche Ergebnisse wie das Mausmodell.

Für den Versuch wurden Embryonen vom Bruttag 16 und 17 verwendet (s. 2.2.12), da die Embryonen zu diesem Zeitpunkt kein ausgebildetes Immunsystem haben (Deryugina & Quigley 2008). Vor der Injektion über die chorioallantoiden Blutgefäße wurde B10AP radioaktiv über Desferrioxamin (s. 2.2.11) mit Gallium-68 markiert (Vosjan *et al.* 2010). Mittels PET/CT-Messung wurde ein sehr hoher Anteil des Radiosignals von B10AP in der Leber nachgewiesen (Abb. 11 A). Das spiegelte die typische Ausscheidung radioaktiv markierter Antikörper ohne Bindung an eine Zielstruktur wider (Boyle et al. 1992, Sands et al. 1987). Des Weiteren war nach Auswertung der PET/CT-Daten keine eindeutige Akkumulationen von B10AP in weiteren Organen oder Geweben zuerkennen (Abb. 11 B). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass B10AP keine Kreuzreaktion mit anderen zugänglichen Oberflächen im Hühnerembryo eingeht.

Für die VHH-Domäne B10 konnte nach Inkubation in Mausserum eine spezifische Bindung an Amyloidfibrillen nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte der Antikörper *ex vivo* und *in vivo* keine unspezifischen Wechselwirkungen. Er wurde daher als ein geeigneter Kandidat für den weiteren Einsatz im Mausmodell zur Entwicklung eines Detektionssystems der AA-Amyloidose eingeschätzt.

3.2 B10AP induziert eine auf IgG-basierte Immunogenität in NMRI Mäusen

Da B10AP bisher noch nicht im Tier getestet wurde, sollte zunächst die Aktivierung einer IgG-Antikörper-basierenden Immunantwort in NMRI Mäusen untersucht werden. NMRI ist ein Auszuchtstamm von Mäusen, die eine genetische Varianz aufweisen. Dadurch stellen sie eine natürliche Population dar und sind ideal für immunologische Studien geeignet. B10AP wurde an drei aufeinander folgenden Tagen in vier Tiere injiziert. Diese Injektionen wurden zwei Wochen später auf gleiche Art und Weise wiederholt (Abb. 12). Als Negativkontrolle wurde das als nicht-immunogen eingestufte Peptid p5 (Wall et al. 2011b), sowie die Pufferlösung PBS in weitere vier Mäuse injiziert. Zur Überprüfung der Bildung von IgG-Antikörpern, wurden wöchentlich Blutseren aller Mäuse entnommen. Als Referenzen dienten die entsprechenden Präimmunseren, die vor den ersten Injektionen entnommen wurden.

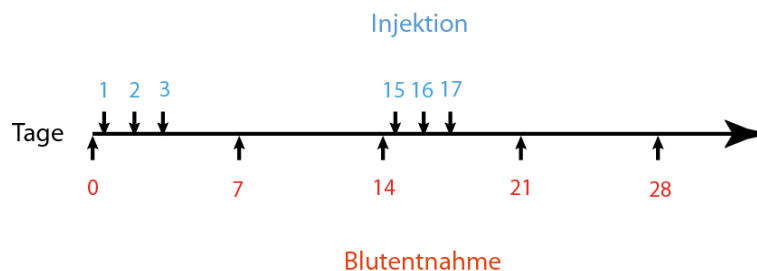


Abbildung 12: Zeitschema zur Injektion von B10AP und dem Peptid p5 in vier NMRI Mäuse zur Untersuchung der Immunogenität.

Nach 28 Tagen wurden die Tiere durch eine Überdosis Ketamin/Xylazin mit anschließender Herzpunktion getötet. Zur Überprüfung der Immunogenität von B10AP und dem Peptid p5 wurde ein ELISA gegen immobilisiertes B10AP bzw. Peptid p5 mit den, aus den Mäusen gewonnenen Blutseren, durchgeführt (Abb. 13). Die Detektion von IgG-Antikörpern gegen B10AP resultierte in sehr hohen Absorptionssignalen (4 AU; entspricht messbarem Maximum) an den Tagen 7 bis 28 nach Antigenerstkontakt im Vergleich zum Präimmunserum (Tag -1). Dabei konnte zusätzlich ein Anstieg der Signalstärke über den Untersuchungszeitraum von vier Wochen beobachtet werden (Tag 7-28). Im Gegensatz dazu war der Absorptionswert für die Detektion von anti-p5 IgG-Antikörpern über die Zeit konstant bei einem Absorptionswert von 1 AU. Das lässt sich durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen p5 und einzelnen Serumkomponenten erklären. Das Peptid p5 ist ein stark positiv geladenes Molekül, welches negativ geladene Oberflächen binden könnte.

Für eine quantitative Aussage über die Bildung von anti-B10AP IgG-Antikörpern wurde zusätzlich der Titer bestimmt. Diese Bestimmung wird in den Leitlinien FDA und EMA zur Charakterisierung von „*anti-drug antibodies*“ (ADA) vorgeschlagen. Diese Tests sollen die Sicherheit und Effektivität von therapeutischen Proteinprodukten für spätere klinische Tests gewährleisten. Unter anderem werden die Bestimmung des Titers und Tests zur Untersuchung der neutralisierenden Wirkung von ADA vorgeschlagen. Daran anlehnend wurden weitere Experimente mit den Serumproben der B10AP immunisierten Mäuse durchgeführt.

Die Titerbestimmung erfolgte pro Tier durch einen direkten ELISA (Abb. 14 A). Für den Test auf anti-B10AP IgG-Antikörper wurden die Mausseren verwendet, die 28 Tage nach Antigenkontakt entnommen wurden. In vorbereitenden Kontrollexperimenten wurde ein Grenzwert für ein positives ELISA-Signal ermittelt und ab einer Absorption über 0,5 definiert. Zur Bestimmung des Titers wurde eine serielle Verdünnung des Immunserums durchgeführt, bis der Grenzwert unterschritten wurde. Bei drei der vier Proben wurde dies bei einer Verdünnung von 1:50.000 erreicht. Das bedeutet, die vorhergehende Verdünnung von 1:10.000 ist die letzte, bei der Werte oberhalb der kritischen

Absorption von 0,5 gemessen wurde. Daraus ergibt sich für die anti-B10AP-IgG-Antikörper ein Titer von 10.000.

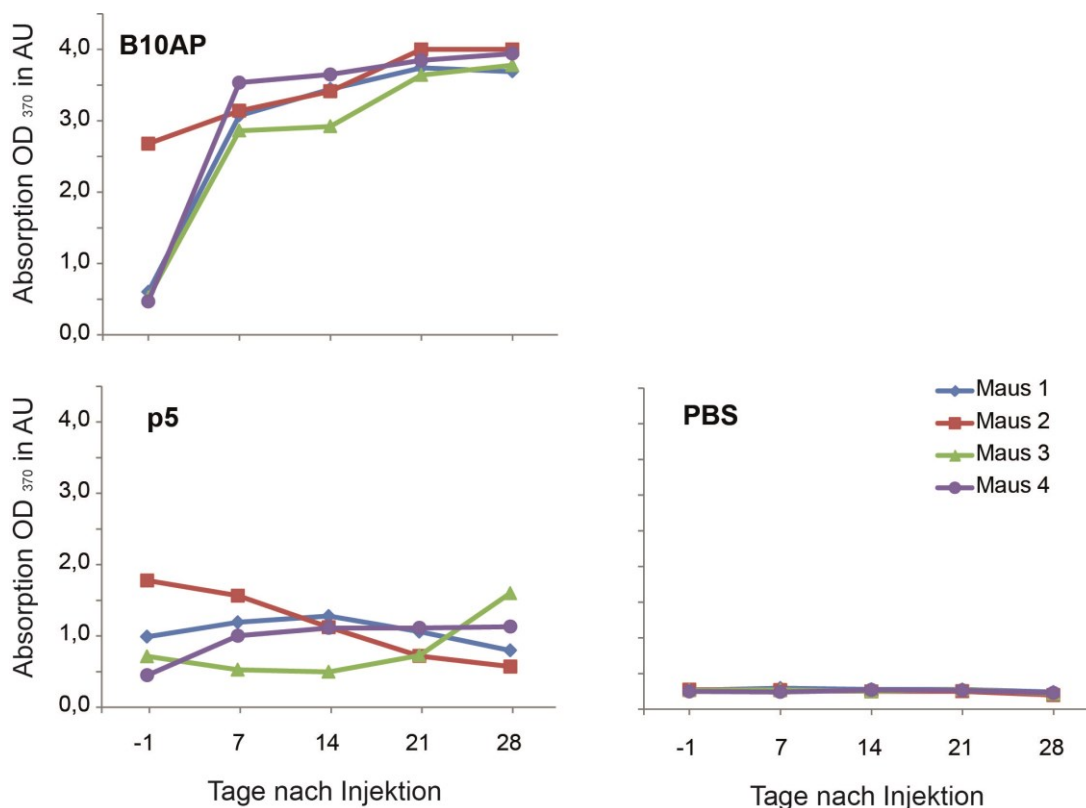


Abbildung 13: B10AP besitzt eine hohe Immunogenität in NMRI Mäusen. Den Versuchstieren wurde das entsprechende Protein an drei aufeinander folgenden Tagen injiziert. Das wurde nach 14 Tagen zur Auslösung einer sekundären Immunantwort gegen das injizierte Protein wiederholt. Bereits 7 Tage nach Injektion von B10AP wurden mittels direktem ELISA anti-B10AP-IgG in den immunisierten Mäusen nachgewiesen. Das Niveau der detektierten IgG blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum stark erhöht. Die Menge von anti-p5-IgG blieb über die Zeit unverändert und vergleichbar zum Präimmenserum. Den Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Deren Seren wurden hier auf PBS zur Kontrolle des ELISA getestet.

Mithilfe eines Spot Blots wurde weiterhin untersucht, ob die anti-B10AP- IgG-Antikörper eine neutralisierende Wirkung auf die Bindung von B10AP zu Amyloidfibrillen haben. Dabei wurden die Seren der vier Mäuse jeweils 1:500 verdünnt und zur Inkubation mit B10AP für 30 min bei 4 °C verwendet. Seren von mit PBS injizierten Mäusen und ein Ansatz ohne Mausserum dienten als Kontrolle. Die Lösungen wurden auf einer Nitrocellulose-Membran inkubiert, auf der zuvor A β (1-40)-Fibrillen immobilisiert wurden. Die erfolgreiche Bindung von B10AP an die Amyloidfibrillen wurde über einen anti-His₆-Peroxidase-Antikörper und eine densitometrische Auswertung nachgewiesen (Abb. 14 B). Die Werte der vier verschiedenen Mausseren wurden gemittelt und als Serum (B10) bzw. Serum (PBS) angegeben. Es wurde beobachtet, dass die Bindung von B10AP an die Amyloidfibrillen

unabhängig von der Zugabe der verwendeten Mausseren war. Die von den Mäusen gebildeten anti-B10AP-Antikörper neutralisieren die Bindungseigenschaften des B10AP demnach nicht.

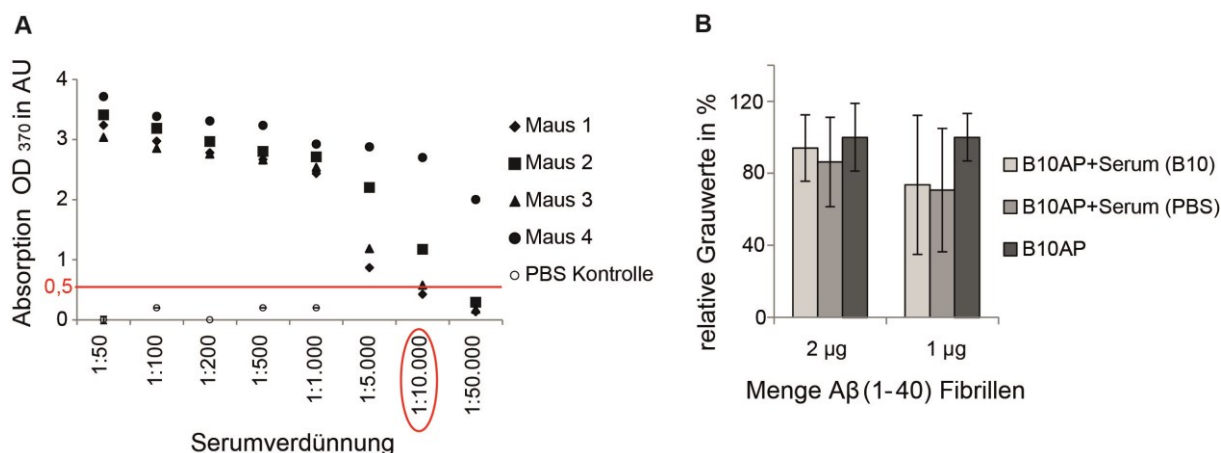


Abbildung 14: Charakterisierung der anti-B10AP Antikörper. (A) Titerbestimmung von anti-B10AP Antikörpern in vier verschiedenen Mäusen die jeweils 3 nmol B10AP injiziert bekamen. Nach serieller Verdünnung wurde die Konzentration bestimmt, bei der die Absorptionssignale unterhalb des kritischen Wertes von 0,5 (rote Linie) liegen. Die Verdünnung vor dieser Konzentration entspricht dem Titer (rot markiert). (B) Die in den Mausseren enthaltenen Komponenten haben keinen negativen Effekt auf die Bindung von B10AP an Aβ(1-40)-Fibrillen. Dazu wurde ein Spot Blot durchgeführt, bei dem 10 µg/ml B10AP mit 1:500 verdünntem Mausserum aus PBS- bzw. B10AP-Mäusen (Serum (PBS) bzw. Serum (B10)) inkubiert wurde. Auch nach der Zugabe, der in dem gewonnen Mausserum vorhandenen Antikörpern zu B10AP, kann dieser Amyloidfibrillen detektieren. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (n = 4).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass B10AP, im Vergleich zum Peptid p5, eine starke Immunogenität besitzt. Für die anti-B10AP-IgG-Antikörper konnte ein Titer von 10.000 bestimmt werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Antikörper die Interaktion zwischen B10AP und Amyloidfibrillen nicht abschwächen.

3.3 Herstellung neuartiger Antikörperformate auf Grundlage der B10-Domäne

Die alkalische Phosphatase wurde verwendet, um eine Bivalenz der VHH-Domäne B10 zu erzeugen und um diese direkt *in vitro* nachweisen zu können. Für Experimente *in vivo* kann, wie in den vorangegangenen Experimenten zur Immunogenität gezeigt wurde, die Größe und der bakterielle Ursprung der AP von Nachteil sein. Andererseits heben die detektierten anti-B10AP-Antikörper die Bindung von B10AP an reife Amyloidfibrillen nicht auf.

Ziel war es, eine Auswahl strukturell und funktionell diverser Antikörperformate mit unterschiedlichen Eigenschaften herzustellen, die u.a. eine geringere Immunogenität als das zuvor untersuchte B10AP aufweisen. Deshalb sollten in weiteren Experimenten, ausgehend von der B10-Domäne, neue

multivalente und bispezifische Konstrukte generiert werden (Abb. 15). Zur zielgerichteten Konstruktion der rekombinanten Gensequenzen wurden dabei die vorher analysierten physikochemischen Eigenschaften des B10AP und B10-Antikörpers genutzt.

Durch den Vergleich mit anderen VHH-Antikörpern (z.B. Coppieters et al. 2006) ist anzunehmen, dass der B10-Antikörper aufgrund seiner Größe (ca. 15 kDa) eine kurze biologische Halbwertszeit im Mausmodell aufweist. Die Nieren scheiden Proteine dieser Größe sehr schnell aus (Vaneycken et al. 2011, Strohl 2015). Darüber hinaus liegt die Affinität des monovalenten B10 für Amyloidfibrillen im dreistelligen nanomolaren Bereich. Um die physikochemischen und funktionellen Eigenschaften von B10, vor allem die Affinität, Serumhalbwertszeit, Spezifität und *in-vivo*-Stabilität zu verbessern, sollte dieser systematisch durch gentechnische Modifikation mit verschiedenen Fusionspartnern gekoppelt werden. Insgesamt wurden fünf neue B10-Antikörper hergestellt (Abb. 15, Tab. 17). Dazu wurden Linker verwendet, die zum einen der Gelenkregion eines IgG-Lamaantikörpers (Conrath et al. 2003) und zum anderen eines IgG-Mausantikörpers (Pack & Plückthun 1992) entsprechen. Diese Linker wurden ausgewählt, da VHH-Domänen ursprünglich im Lama nachgewiesen wurden bzw. weil die B10-Konstrukte später in Mäusen getestet werden sollen und die Immunogenität der neuen Konstrukte gering gehalten werden sollte.

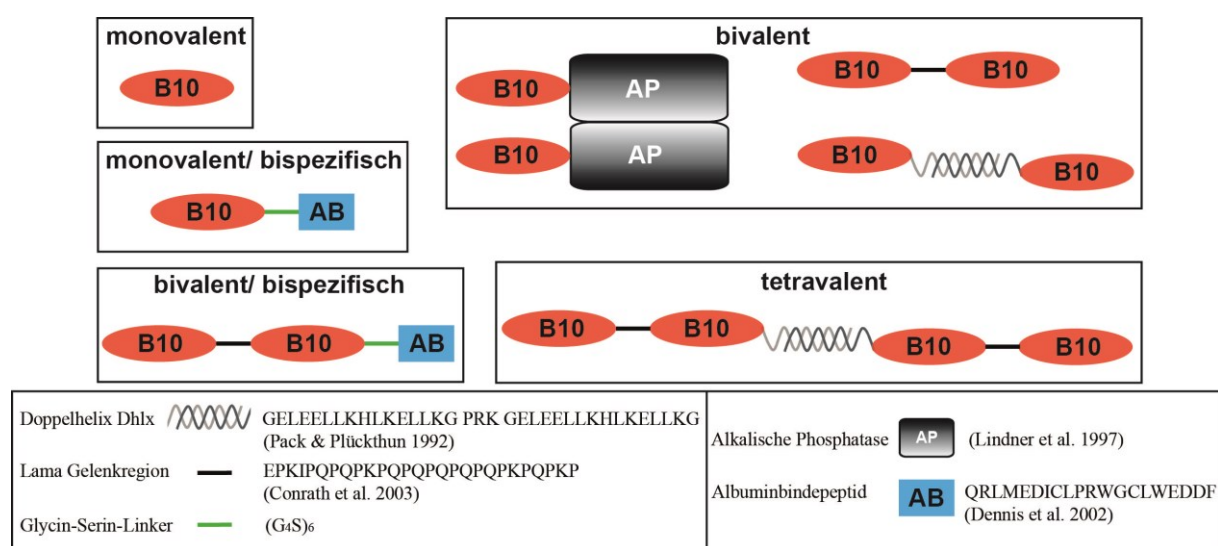


Abbildung 15: Schematische Darstellung der verwendeten B10-Antikörperfragmente. Der monovalente B10, der monovalente und bispezifische B10AB, die bivalenten B10AP, B10B10 und B10DhLx, der bivalente und bispezifische B10B10AB und der tetraivalente B10B10DhLx. B10 und B10AP wurden bereits in Habicht *et al.* 2007 veröffentlicht.

Zum einen wurde B10 über einen Linker kovalent an eine zweite B10-Domäne gekoppelt (B10B10, Abb. 15). Es wird vermutet, dass sich dadurch längere Serumhalbwertszeiten und bessere Affinitäten

ergeben. Durch die Bindung an eine Albuminbindesequenz (AB) (Dennis et al. 2002) ließ sich ein bispezifisches B10 Konstrukt (B10AB) generieren. B10AB und die um eine B10-Domäne erweiterte Variante B10B10AB sollten durch die Interaktion mit Serumalbumin gezielter in inflammatorische Bereiche infiltrieren und länger im Organismus verbleiben. Um multivalente Konstrukte herzustellen, wurden außerdem Doppelhelices (Dhlx) eingesetzt (Eisenberg et al. 1986, Pack et al. 1992, Müller et al. 1998, Willuda et al. 2001). Diese Helix-Schleife-Helix-Motive wurden gentechnisch an die B10-Domäne gekoppelt. Durch die Interaktion zweier Doppelhelices sollten die angehängten B10-Domänen in räumliche Nähe kommen. Dadurch entsteht ein bivalentes B10(Dhlx)₂B10, bzw. ein multivalentes Konstrukt B10B10(Dhlx)₂B10B10. Zur Vereinfachung werden diese Konstrukte im Weiteren als B10Dhlx und B10B10Dhlx abgekürzt.

Tabelle 17: Durch „ExPASy“ theoretisch ermittelte molekularen Größen und isoelektrischen Punkte (pI) der B10-Antikörper.

Protein	MW (kDa)	pI
B10	15,7	9,15
B10AP	63,6	6,36
B10B10	32,8	9,64
B10AB	21	7,9
B10B10AB	37,9	9,27
B10Dhlx	21,5	9,15
B10B10Dhlx	38,6	9,52

3.3.1 *In silico* Strukturvorhersage für B10B10AB und B10B10Dhlx

Um einen Überblick über die mögliche Faltung der B10-Formate und somit Rückschlüsse auf die Funktionalität der einzelnen Komponenten zu erhalten, wurden Homologie-basierte Strukturmodelle für B10B10AB und B10B10Dhlx auf Grundlage der bekannten Strukturen des B10 (PDB: 3LN9) und der Dhlx-Domäne (PDB: 1QP6) mithilfe des Programms RaptorX errechnet (Peng und Xu 2011a, 2011b). Diese Formate wurden ausgewählt, da sich an ihnen alle in den B10-Formaten verwendeten Domänen (B10, AB, Dhlx) und Linkerregionen ((G₄S)₆, Lama IgG2 Gelenkregion, murine Gelenkregion) darstellen lassen.

A



B

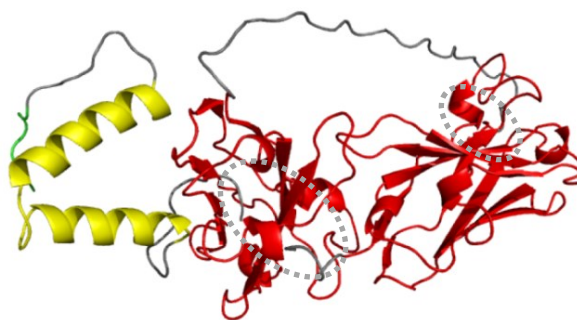


Abbildung 16: Computer-basierte Strukturanalyse von B10B10AB und B10B10Dhlx. Die Homologie-Modelle für B10B10AB (A) und B10B10Dhlx (B) weisen zwei zueinander senkrecht stehende B10-Domänen (rot) auf, die über Linkerregionen (grau) miteinander und mit der exponierten Doppelhelixstruktur (Dhlx, gelb) bzw. dem Albuminbindepeptid (AB, blau) verbunden sind. Die Paratope der B10 Moleküle wurden im grau gestrichelten Kreisen markiert. Der N-terminale Flag-Tag, sowie der C-terminale His-Tag sind in grün dargestellt. Die Berechnung der Modelle basiert auf den Referenzen B10 (PDB: 3LN9) und Dhlx (PDB: 1QP6) und wurde mit dem Programm RaptorX durchgeführt.

Die beiden miteinander verbundenen B10-Domänen (Abb. 16 rot) der Modelle stehen in einer senkrechten räumlichen Beziehung zueinander, während die Dhlx (Abb. 16 B gelb) bzw. AB (Abb. 16 A blau) eine exponierte Lage im Bezug zu den B10-Domänen aufweisen. Gut zu erkennen sind außerdem die β -Fasstrukturen der B10-Domänen bestehend aus acht β -Faltblättern. Die Paratope der B10-Domänen mit den drei CDR wurden mit grauen Kreisen hervorgehoben. Das Albuminbindepeptid wurde durch das Programm als kurze Helix mit zwei Windungen berechnet, während die Doppelhelix erwartungsgemäß je vier Windungen aufweist.

Den Modellen zufolge, können die einzelnen B10-Domänen scheinbar unabhängig voneinander an Amyloidfibrillen binden und behindern dabei, aufgrund der exponierten Lage, nicht die Funktion der Doppelhelix bzw. des Albuminbindepeptids. Basierend auf diesen Daten ist davon auszugehen, dass AB ohne sterische Hinderung die, aus vielen α -Helices bestehende, Albuminstruktur binden kann und B10B10Dhlx die angestrebte dimere Struktur über die Dhlx ausbildet.

3.3.2 Multivalente Varianten der B10-Domäne wurden erfolgreich hergestellt

Nach der gentechnischen Herstellung der B10-Antikörper (s. 2.2.1) wurde deren lösliche periplasmatische Expression in *E.coli* RV308 untersucht. Zunächst wurden alle Antikörper in einem Expressionssystem und unter Kontrolle des *lac*-Promotors (Plasmid p41) bei einer Kultivierungstemperatur von 26°C getestet (Abb. 17). Lediglich B10 und B10B10 konnten auf diese Weise löslich exprimiert werden, was durch Western Blots unter Detektion der vorhandenen (His)₆-Tags mithilfe eines anti-His₆-HRP analysiert wurde (Abb. 17 B). Für alle anderen B10-Formate konnte kein

lösliches Produkt nachgewiesen werden. Zur Steigerung des Anteils löslichen Proteins wurden folgende Parameter schrittweise verändert (Abb. 17 A):

- (1) *lac*-Promotorstärke,
- (2) Koexpression vom Faltungshelfer Skp (Hayhurst *et al.* 1999, Schlapschy *et al.* 2004) und
- (3) Kultivierungstemperatur.

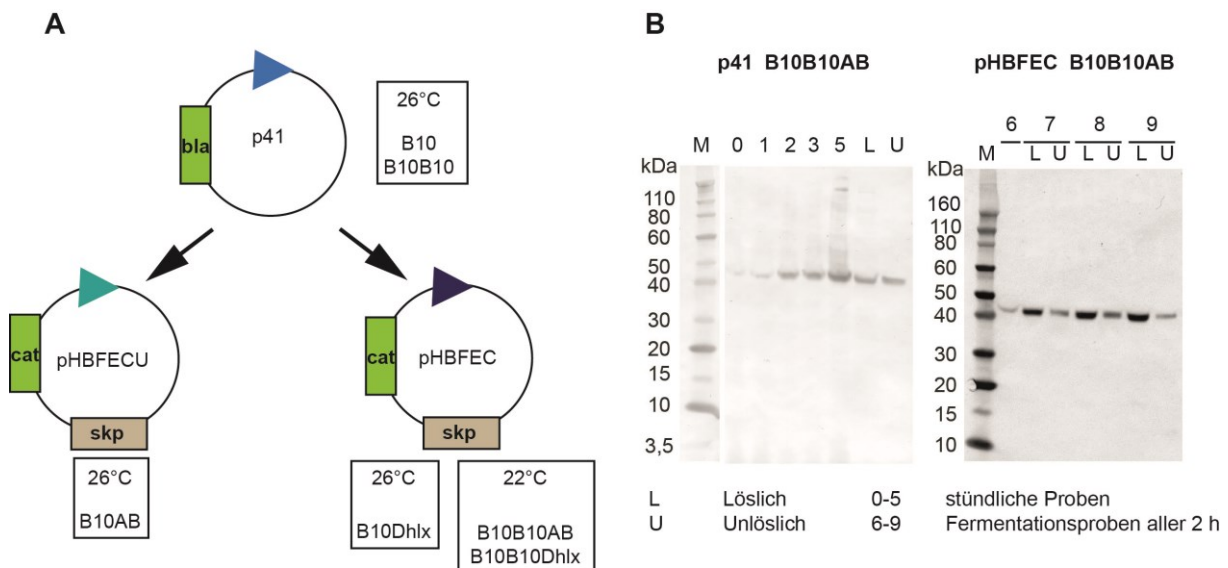


Abbildung 17: Herstellung der löslichen B10-Konstrukte mithilfe verschiedener Plasmide. (A) Zuerst wurden alle Konstrukte im Plasmid p41, das ein Wildtyp-*lac* Operon (blau) und eine Ampicillinresistenz besitzt, auf lösliche Expression der VHH-Antikörper getestet. Lediglich B10 und B10B10 wurden löslich exprimiert. Daraufhin wurden das Plasmid pHBFEUCU, mit einem starken *lac*-Operon (türkis), und pHBFEC, mit einem abgeschwächten *lac*-Operon (dunkelblau) getestet. Beide Plasmide tragen eine Chloramphenicolresistenz und koexpressieren das Chaperon Skp. Durch eine Verringerung der Kultivierungstemperatur von 26°C auf 22°C wurden die Konstrukte B10B10AB und B10B10Dhlx in pHBFEC erfolgreich löslich exprimiert. (B) Im Western Blot war ein deutlicher Unterschied bei der löslichen (L) Expression von B10B10AB mithilfe des Vektors p41 bzw. pHBFEC zu erkennen. Dazu wurde B10B10AB mithilfe eines anti-His-HRP Antikörpers nachgewiesen.

Der verwendete stärkere *lac*-Promotor des Vektors pHBFEUCU trägt eine Mutation durch Basenaustausch in der CAP Bindestelle (C), sowie die *lacUV5* Mutation (U) (Kraft *et al.* 2007). Konnte durch diese Änderung kein höherer Anteil löslichen Proteins erzeugt werden, wurde in einem weiteren Schritt ein abgeschwächter Promotor bei 26°C für die Expression eingesetzt (Plasmid pHBFEC). Durch eine verlangsamte Expression sollte der Anteil löslichen Proteins im Periplasma erhöht werden. Alle Plasmide mit veränderter Promotorstärke koexpressierten ebenfalls das Chaperon Skp, was den Anteil löslichen Proteins weiterhin erhöhen sollte. Im Fall der bivalenten Proteine B10B10AB und B10B10Dhlx wurde durch zusätzliche Verringerung der Kultivierungstemperatur auf 22°C dieses Ziel erreicht.

Tabelle 18: B10-Antikörper und deren Kultivierungsbedingungen.

Protein	Plasmid	<i>lac</i>- Promotor	Chaperon	Temperatur
B10	p41	wildtyp	-	26°C
B10AP	ptet	wildtyp	-	26°C
B10B10	p41	wildtyp	-	26°C
B10AB	pHBFECU	stark	Skp	26°C
B10B10AB	pHBFEC	schwach	Skp	22°C
B10Dhlx	pHBFEC	schwach	Skp	26°C
B10B10Dhlx	pHBFEC	schwach	Skp	22°C

Nach der Fermentation aller B10-Antikörperformate im 3 L Maßstab, wurden die Proteine über drei Stufen mittels FPLC gereinigt und konzentriert (s. 2.2.4). In Abbildung 18 ist die Reinigung von B10B10 exemplarisch für alle anderen B10-Formate dargestellt.

Zu Beginn wurde die, durch einen Hochdruckhomogenisation aufgeschlossene Zellsuspension, zentrifugiert, filtriert und auf eine Ni-Chelatchromatographiesäule (Abb. 18 A) aufgetragen. Die Hauptfraktionen (Abb. 18 A, Fraktionen 3a+b) wurden anschließend vereint und über eine Ionenaustauschchromatographiesäule (IEC) weiter gereinigt (Abb. 18 B). Abschließend wurden die Proben über eine weitere IEC (MonoBeads Säule) gereinigt und stark konzentriert (Abb. 18 C). Dabei wurde mit SP Sepharose bzw. Mono S-Säulen gearbeitet. Eine Ausnahme bildete B10AP, für welches Anionenaustauschmaterial (QSepharose, MonoQ) verwendet wurde. Bei der anschließenden Analyse der Reinheit von B10B10 (Abb. 19) mittels SDS-PAGE waren keine Fremdbanden nachweisbar.

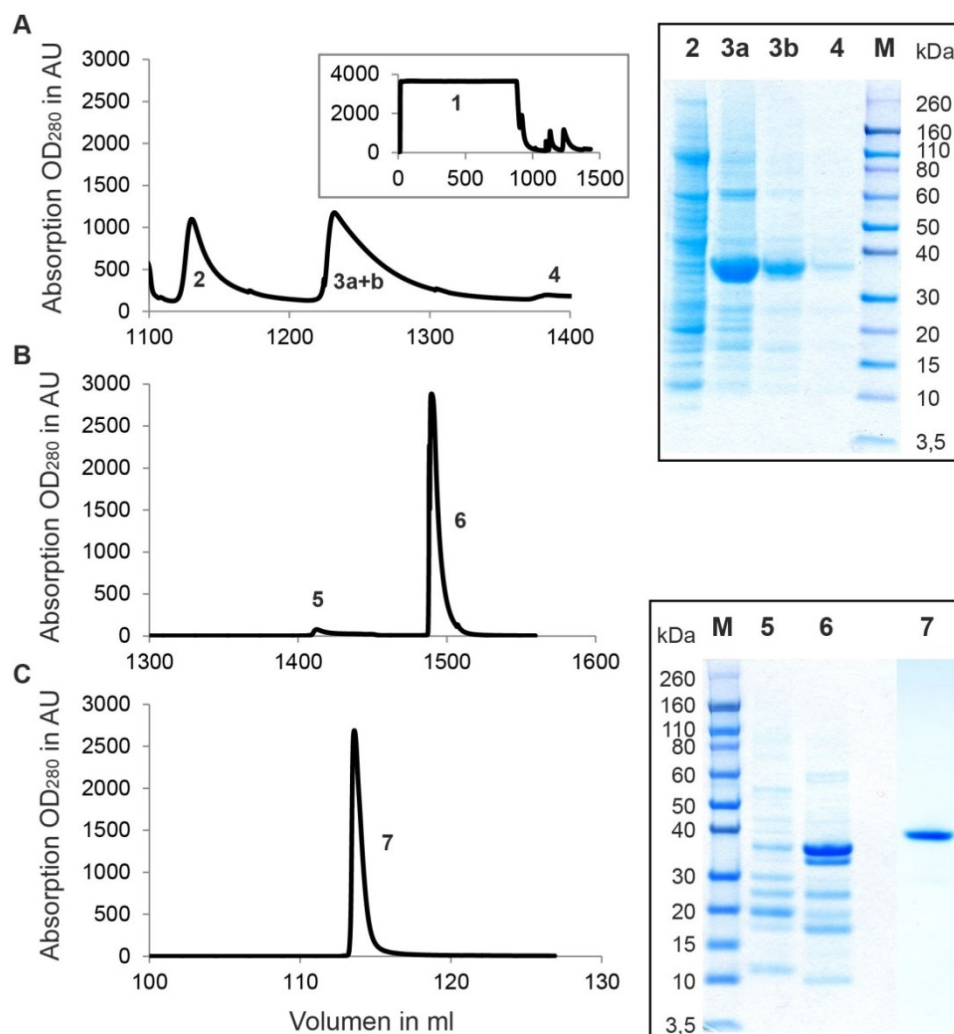


Abbildung 18: Reinigung des B10B10-Antikörpers. Die aufgeschlossene Probe wurde zuerst über eine NiNTA-Affinitätschromatographie (IMAC) (A) und anschließend über eine SP Sepharose (B) und MonoS (C) Ionenaustauschchromatographiesäule (IEC) mithilfe eines Stufengradienten von Puffer B gereinigt. Für die IMAC wurde folgender Puffer verwendet: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 8. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol enthaltendem Puffer. Für die IEC wurde 20 mM NaH₂PO₄ pH 8 verwendet. Eluiert wurde mit 1 M NaCl im Puffer. Die Hauptpeaks wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf den Anteil des Zielproteins B10B10 untersucht. 1: Durchfluss NiNTA; 2: 25 % Eluat NiNTA; 3: 70 % Eluat NiNTA, 4: 100 % Eluat NiNTA; 5: 20 % Eluat SP-Sepharose; 6: 80 % Eluat SP-Sepharose; 7: 80 % Eluat MonoS

Auf diese Weise konnte beispielsweise für B10B10 aus 130 g Zellpellet (Feuchtbio-masse) ca. 47 mg Zielprotein hergestellt werden. Die Ausbeuten der Fermentationen der anderen B10 Konstrukte sind in Tabelle 19 aufgelistet. Es fällt auf, dass B10B10AB und B10B10Dhlx im Vergleich zu den anderen Antikörpern am schlechtesten löslich exprimiert und gereinigt werden konnten. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass für beide B10-Formate bereits mit einem abgeschwächten *lac*-Promotor, dem Chaparon Skp und einer verringerten Kultivierungstemperatur im Bereich der rekombinanten Expression viel Optimierungsarbeit geleistet wurde.

Tabelle 19: Ausbeuten rekombinant hergestellter und gereinigter B10-Formate

Protein	Feuchtbio­masse (FBM) in g	Masse Zielprotein (ZP) in mg	Verhältnis FBM/ZP x 10 ⁻³
B10AP	130	47	0,36
B10	107	86	0,80
B10B10	120	63	0,53
B10AB	115	67	0,58
B10B10AB	119	8	0,07
B10Dhlx	120	34	0,28
B10B10Dhlx	106	6	0,06

Alle aufgearbeiteten und gereinigten Proben wurden mittels SDS-PAGE auf ihre korrekte Masse und Reinheit geprüft (Abb. 19). Die Reinheit der B10-Antikörper wurde, aufgrund der sehr schwachen Fremd­banden, als angemessen für weitere Tierversuche eingeschätzt.

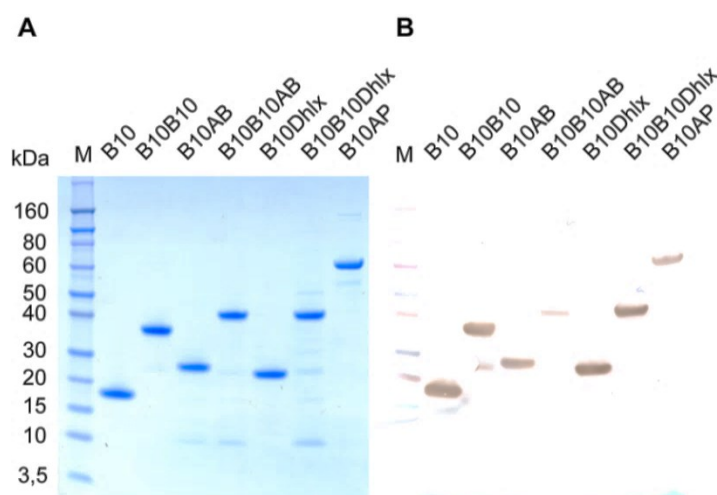


Abbildung 19: SDS-Gel (A) und Western Blot-Analyse (B) der rekombinant hergestellten und gereinigten B10-Formate. Es wurden von jedem B10 Protein 2 µg aufgetragen und auf der Nitrozellulose-Membran mithilfe eines anti-His-HRP Antikörpers detektiert.

3.4 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der B10-Formate

Nach der erfolgreichen Herstellung von B10, B10B10, B10AB, B10B10AB, B10Dhlx und B10B10Dhlx wurde deren Funktionalität durch die Bindung an Amyloidfibrillen untersucht. Die B10-Formate wurden als Alternativen zu B10AP und B10 entwickelt, weshalb deren Bindungseigenschaften mit denen von B10AP und B10 verglichen wurden.

3.4.1 Die B10-Formate binden A β (1-40)- und SAA-Fibrillen *in vitro*

Zur Überprüfung der Funktionalität der B10-Formate wurde ein Spot Blot durchgeführt. Dazu wurden A β (1-40)-Fibrillen auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit dem jeweiligen B10-Antikörper inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend über anti-His₆-HRP detektiert. Als Kontrolle wurde Spots ohne Amyloidfibrillen verwendet (Abb. 20 A).

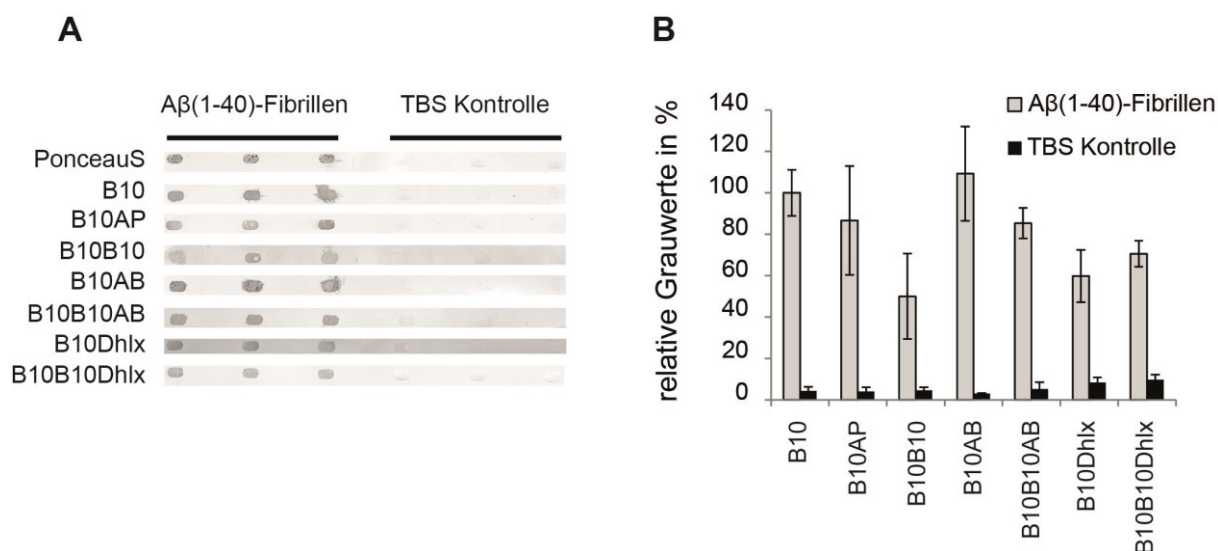


Abbildung 20: Nachweis der spezifischen Bindung aller B10-Antikörperkonstrukte an A β (1-40)-Fibrillen im Spot Blot. Dazu wurden 2 μ g A β (1-40)-Amyloidfibrillen auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit dem entsprechenden B10-Antikörper inkubiert. Eine erfolgreiche Bindung wurde mithilfe eines anti-His-HRP-Antikörpers nachgewiesen. Die ermittelten Grauwerte der einzelnen Spots (A) wurden relativ zur spezifischen Bindungsstärke von B10 dargestellt (B). Als Kontrolle diente TBS (schwarz) anstelle der Amyloidfibrillen (hellgrau). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3).

Wie in Abbildung 20 B zusehen, binden alle B10-Antikörper spezifisch an die Amyloidfibrillen. Die Werte variieren teilweise stark, es ist jedoch immer ein deutlicher Unterschied zwischen der Bindung der Antikörper an Amyloidfibrillen bzw. deren Kontrollen ohne Fibrillen zu erkennen. Die in diesem Experiment im Vordergrund stehende Funktionalität der Bindungsdomänen konnte für alle Konstrukte bestätigt werden. Die Signalunterschiede sind vermutlich darauf zurück zu führen, dass stets die gleiche Massekonzentration statt der Molarität, der B10-Formate eingesetzt wurde und die Anzahl der Bindungsdomäne B10 von Konstrukt zu Konstrukt verschieden ist (siehe Abb. 15 Kapitel 3.3).

Da die Antikörper entwickelt wurden, um in späteren Mausexperimenten an SAA-Fibrillen zu binden, wurde diese Eigenschaft ebenfalls zuvor in Form eines Spot Blots überprüft (Abb. 21). Der Versuchsansatz ist vergleichbar zu dem o.g. Experiment, wobei SAA-Fibrillen anstelle von A β (1-40)-Fibrillen immobilisiert wurden. Es konnte erneut eine spezifische Bindung aller B10-Formate detektiert werden. Die B10-Antikörper haben, bis auf B10AB und B10Dhlx, im Vergleich zu monovalentem

B10 besser an SAA-Fibrillen, als an A β (1-40)-Fibrillen gebunden. B10AB zeigte eine schwächere Bindung und B10Dhlx eine, zu A β (1-40)-Fibrillen vergleichbare Bindung an SAA-Fibrillen.

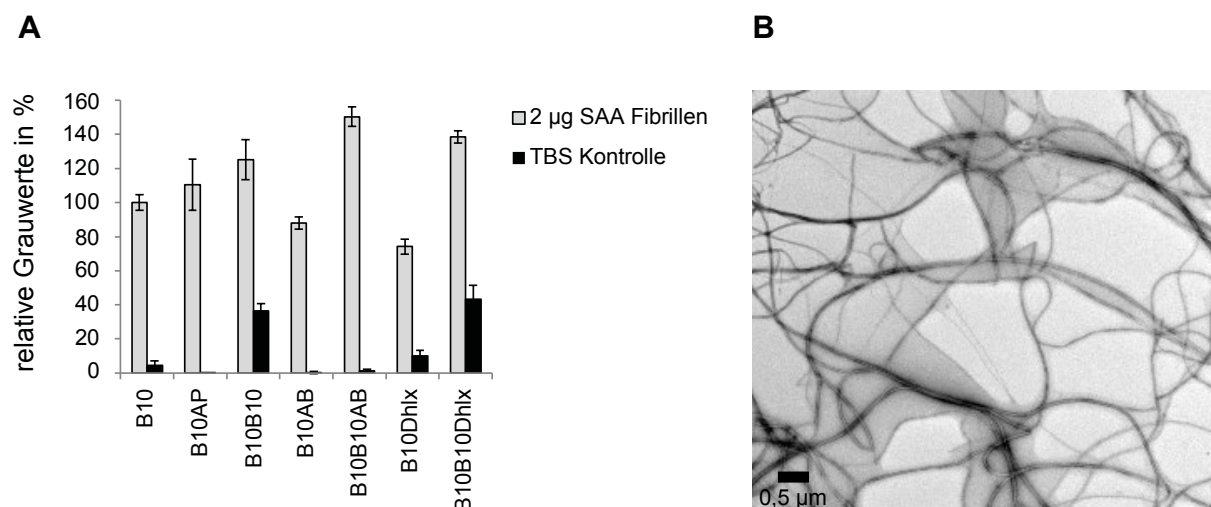


Abbildung 21: Die B10-Formate binden im Spot Blot (A) spezifisch reife SAA-Fibrillen (B). Die erfolgreiche Bindung wurde über einen anti-His-HRP-Antikörper detektiert. Die ermittelten Grauwerte wurden relativ zum Wert des B10-Antikörpers dargestellt. Als Kontrolle diente TBS (schwarz). Die SAA-Fibrillen wurden zuvor elektronenmikroskopisch (TEM) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 3).

Anhand dieser Daten lässt sich zusammenfassen, dass alle neu entwickelten B10-Antikörperformate funktionell in *E. coli* durch Hochzelllichtfermentationen hergestellt und erfolgreich gereinigt wurden. Die Antikörper zeigten die spezifische Bindung an Amyloidfibrillen bestehend aus A β (1-40) und SAA.

3.4.2 B10AB und B10B10AB erkennen spezifisch murines Serumalbumin

Die Formate B10AB und B10B10AB tragen C-terminal die Peptidsequenz QRLMEDICLPRWGCLWEDDF, die murines Serumalbumin (MSA) bindet (Dennis et al. 2002). Ob diese Interaktion zwischen dem albuminbindenden Peptid und MSA auch nach der Kopplung an die B10-Domäne vorhanden ist, wurde mithilfe eines ELISA verifiziert.

Dazu wurden 3 μ g MSA bzw. zur Negativkontrolle BSA auf Maxisorp-Platten immobilisiert und anschließend mit 10 μ g/ml des jeweiligen Antikörpers für eine Stunde inkubiert. Die positive Bindung wurde mithilfe eines anti-His-HRP Sekundärantikörpers nachgewiesen.

B10AB bindet an MSA, während BSA nicht vom Albuminbindepeptid (AB) erkannt wird. Für B10B10AB wurde kein Unterschied zwischen MSA und BSA gemessen.

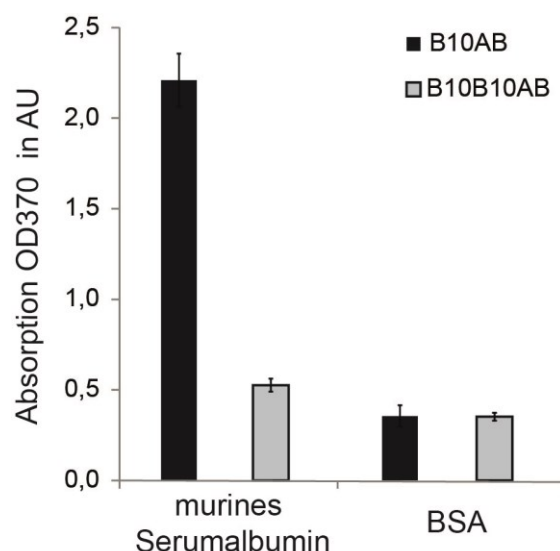


Abbildung 22: Die Bindung von B10AB und B10B10AB an immobilisiertes murines Serumalbumin (MSA) wurde mithilfe eines ELISAs untersucht. An Serum gebundene Antikörper wurden durch einen anti-His-HRP Antikörper nachgewiesen. Als Referenz wurde bovines Serumalbumin (BSA) auf MaxiSorp-Platten immobilisiert. Für B10AB wurde ein deutlicher und für B10B10AB ein geringer Unterschied zwischen MSA und BSA festgestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Möglicherweise wird die Interaktion zwischen Serumalbumin und der Peptidsequenz durch die zweite B10-Domäne räumlich behindert. Bei der vorangegangenen Strukturanalyse von B10B10AB (Abb. 16 A) war zu sehen, dass die beiden B10-Domänen räumlich von der AB-Region getrennt vorliegen. Jedoch könnte der große Linker, der die beiden B10-Domänen miteinander verbindet und in Richtung der AB-Sequenz ragt, zu einer sterischen Hinderung der AB-Region führen. Im Fall des B10AB liegt kein Linker vor, der das AB-Peptid behindern kann. Es wurde daher angenommen, dass B10AB die vorgesehene Funktion der Albuminbindung in der Maus erfüllen kann.

3.4.3 Die neuartigen bivalenten Formate haben eine mit B10AP vergleichbare Affinität für Amyloidfibrillen

Da die B10-Formate als Alternativen zu B10 und B10AP hergestellt wurden, sollte in einem weiteren Experiment die Bindungsaffinität der einzelnen B10-Formate an Amyloidfibrillen im Vergleich zu B10 und B10AP untersucht werden. Dazu wurde die Bindung der Antikörper an A β (1-40)-Fibrillen auf einem SA Chip durch *Surface Plasmon Resonance* (SPR)-Messungen untersucht. Diese Arbeiten wurden von Dr. Peter Hortschansky (HKI Jena) durchgeführt. Zur Berechnung der apparenten K_D -Werte (aK_D) wurde zur Vergleichbarkeit mit früheren Daten (Habicht *et al.* 2007) das 1:1 *steady-state*-Affinitätsmodell für alle B10-Formate angewendet. Jedoch wurde bei fast allen B10-Konstrukten im angewandten Affinitätsmodell nur knapp eine *steady-state*-Phase erreicht. Vor allem bei B10B10Dh1x fällt auf, dass die Messpunkte stark von der errechneten Modellkurve abweichen und keine *steady-*

state-Phase erreicht wurde. Deshalb ist nur eine, zwischen den vermessenen B10-Formaten, vergleichende Auswertung, unter Angabe von apparenten K_D -Werten (aK_D) möglich gewesen. Kinetische Auswertungen der Bindungen waren nicht möglich.

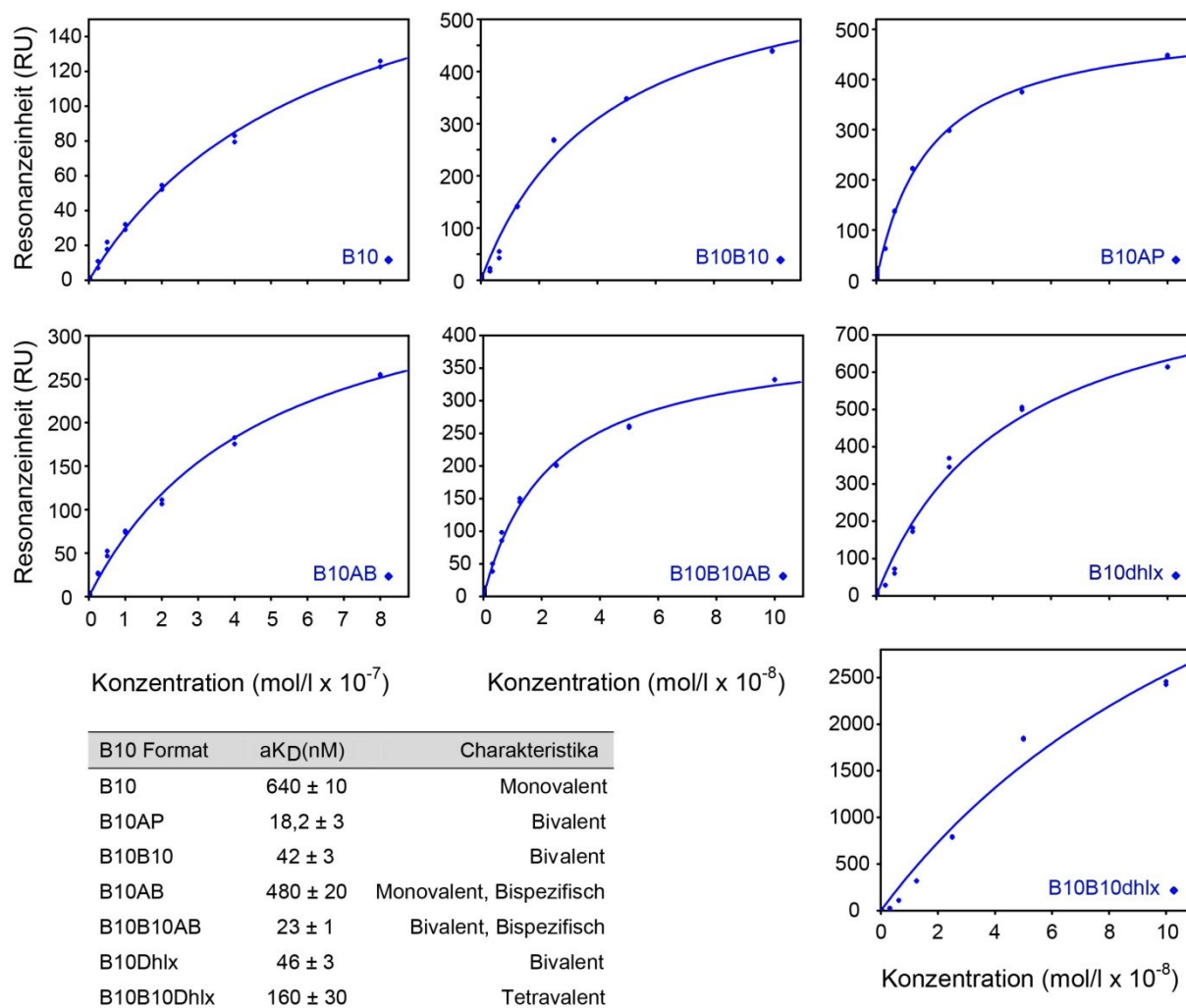


Abbildung 23: Die aK_D -Werte wurden mit dem 1:1 *steady state*-Affinitätsmodell errechnet. Dazu wurde ein SA Chip verwendet auf dem biotinylierte A β (1-40)-Fibrillen immobilisiert wurden. B10 und B10AP wurden als Kontrollen mitgeführt und wiesen vergleichbare aK_D -Werte zur Publikation von Habicht et al. (2002) auf.

Die durch das 1:1 *steady state*-Modell berechneten aK_D -Werte (Abb. 23) des monovalenten Antikörpers B10 und des bivalenten Formats B10AP entsprachen mit 640 nM und 18,2 nM etwa den publizierten Daten von 475 nM und 7,2 nM (Habicht *et al.* 2007). Vergleicht man die aK_D der bivalenten B10-Formate B10B10 (42 ± 3 nM), B10B10AB (23 ± 1 nM) und B10Dhlx (46 ± 3 nM) mit B10AP, so fällt auf, dass sie untereinander vergleichbar und B10B10, B10B10AB und B10Dhlx hoch affin für Amyloidfibrillen sind. Ebenso ist der aK_D des monovalenten Formats B10AB (480 ± 20 nM) vergleichbar mit B10 (640 ± 10 nM), wobei die monovalenten Formate etwa 10-fach schlechter an

Amyloidfibrillen binden, als die bivalenten B10-Antikörper. Lediglich das tetravalente Konstrukt B10B10Dhlx entsprach mit einem Wert von 160 nM nicht der erwarteten höheren Affinität im Vergleich zu den bivalenten B10-Antikörpern.

Die SPR-Untersuchung zeigte, dass alle monovalenten bzw. bivalenten Antikörper ähnliche aK_D -Werte aufweisen. Dabei waren die der bivalenten B10-Formate wie erwartet eine Größenordnung niedriger.

3.5 Immunogenität der verschiedenen B10-Antikörperformate

Nach erfolgreicher Charakterisierung der Bindungseigenschaften aller B10-Formate, sollte im Weiteren geprüft werden, ob diese im Tiermodell eingesetzt werden können. Dazu wurde die Immunogenität der Proteine in NMRI Mäusen wie bereits für B10AP (s. 3.2) ermittelt.

Für die Bestimmung der Immunogenität wurden je vier Mäusen 3 nmol eines B10-Formats intravenös an drei aufeinander folgenden Tagen injiziert. Diese Injektionen wurden 14 Tage später erneut über drei Tage wiederholt. Einen Tag vor der ersten Injektion, sowie danach wöchentlich wurde den Mäusen durch Schwanzpunktion Blut entnommen und Serum gewonnen (Abb. 24). Dieses Serum wurde anschließend in einem ELISA auf anti-B10-Format IgG-Antikörper getestet.

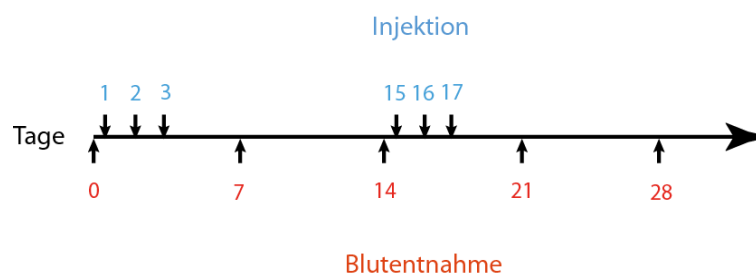


Abbildung 24: Zeitschema zur Injektion der B10-Formate und PBS in jeweils vier NMRI Mäuse zur Untersuchung der Immunogenität.

Bei der anschließenden Analyse der ELISA-Daten (Abb. 25) zur Bildung von IgG-Antikörpern gegen monovalentes B10, wurde kaum ein Unterschied zwischen den Präimmunseren und den Immunseren gemessen. Lediglich bei einer Maus konnte ein stark erhöhtes Signal ab dem 14. Tag nach Injektion des Antikörpers beobachtet werden. Abgesehen von dieser einzelnen Maus, wurden vorrangig Absorptionen bis zu einem Wert von 1 AU detektiert. Eine immunologische Reaktion auf die B10-Domäne wird daher als unwahrscheinlich eingeschätzt. Für das Format B10B10 ergab sich nach der Datenauswertung ein zu den B10-Daten umgekehrtes Bild. Es konnte für drei von vier Tieren ein Absorptionsanstieg auf einen Wert von durchschnittlich 2,2 AU innerhalb der ersten 7-14 Tage

detektiert werden. Lediglich eine Maus zeigte keinen Unterschied zwischen dem Präimmunserum und allen, nach der Injektion des Antikörpers gewonnenen Immunseren. B10B10 löste demnach in der Mehrzahl der untersuchten Tiere eine schwache IgG-vermittelte Immunreaktion aus. Die Injektion von B10AB in vier Mäuse bewirkte bei allen Tieren einen deutlichen Anstieg der Absorptionswerte vom Präimmunserum zum Immunserum. Dabei fällt auf, dass vom Tag 14 auf 21 erneut ein Absorptionsanstieg um eine Einheit auf durchschnittlich 3AU zu verzeichnen ist. Man muss somit von einer IgG-vermittelten Immunogenität der B10AB Antikörper ausgehen, die vor allem zwei Wochen nach Injektion des Antikörpers zu einer deutlichen Produktion von anti-B10AB Antikörpern führt.

Durch die Injektion von B10B10AB wurde ebenfalls eine Immunantwort in Form von anti-B10B10AB IgG-Antikörpern hervorgerufen. Das Absorptionssignal stieg bei drei der vier Mäuse langsam ausgehend vom Präimmunserum über Tag 7 bis Tag 14. Ab Tag 21 verdoppelt sich das Signal auf durchschnittliche 3 AU. Bei einer Maus stieg der Absorptionswert bereits an Tag 7 auf einen Wert von ca. 2,3 AU. Dieses Signalniveau wurde bis Tag 28 beobachtet. Ausgehend von einem sehr niedrigen Absorptionswert für die Präimmunseren von 0,2 AU stieg das Signal innerhalb der ersten 14 Tage für anti-B10Dhlx IgG-Antikörper nur sehr gering auf durchschnittlich 0,7 AU. Erst nach einer weiteren Injektion von B10Dhlx nach 14 Tagen konnte eine Vervierfachung des Absorptionssignals und damit verbunden eine Bildung von anti-B10Dhlx IgG-Antikörpern detektiert werden. B10B10Dhlx verursachte in allen vier getesteten Mäusen einen deutlichen Anstieg der Absorptionswerte von durchschnittlich 0,5 AU auf knapp 2,5 AU. Dieses Signal stieg über die nachfolgenden Wochen bis zu einem Wert von knapp 4 AU, der die Detektionsgrenze des Messgeräts darstellt. Spätestens ab Tag 21 wurde für alle vier Immunseren diese Detektionsgrenze erreicht. B10B10Dhlx erzeugt somit eine sehr starke IgG-vermittelte Immunantwort in den Mäusen.

Vergleicht man die Absorptionssignale aller getesteten murinen Seren fällt auf, dass im Fall der B10-Seren der geringste Unterschied zwischen Präimmunserum und dem Serum von Tag 28 bestand. Außerdem ist bei den B10- und den B10B10-Seren jeweils ein Serum aufgefallen, welches einen großen Unterschied zu den anderen drei getesteten Seren im ELISA aufwies. Für B10 handelte es sich um stark positiv abweichendes Serumsignal und im Fall von B10B10 um ein stark negativ vom Durchschnitt abweichendes Signal. B10AB-Seren wiesen die Besonderheit auf, dass eine Woche nach der ersten und eine Woche nach der zweiten Injektion von B10AB die deutlichen Steigerungen der Absorptionssignale zu beobachten waren. Es wurde kein kontinuierlicher Anstieg an anti-B10AB-Antikörpern verzeichnet. Ebenso verhielt es sich für B10B10AB-Seren, bei denen nach dem zweiten Antigenkontakt ein deutlicher Anstieg der Signale beobachtet wurde. Mäuse, denen B10Dhlx injiziert wurde, wiesen das niedrigste Absorptionssignal für die Präimmunseren auf. Auch nach 7 bzw. 14 Tagen wurde kein deutlicher Anstieg des Signals beobachtet. Das unterscheidet die B10Dhlx-Seren deutlich von allen anderen Seren. Nach dem zweiten Antigenkontakt wurde ein mit B10AB und

B10B10AB vergleichbares Signal gemessen. B10B10Dhlx wies ab einer Woche nach Injektion neben B10AP die höchsten Absorptionssignale auf.

Das bedeutet im Fall von B10AB, B10B10AB und B10Dhlx wurde erst nach der zweiten Injektion des jeweiligen B10-Formats eine deutliche starke Zunahme der Absorption beobachtet. Es kam erst nach dem zweiten Antigenkontakt zu einer deutlichen Erhöhung der anti-B10Format IgG-Konzentration in den Mäusen, was dem Mechanismus der sekundären Immunantwort entspricht.

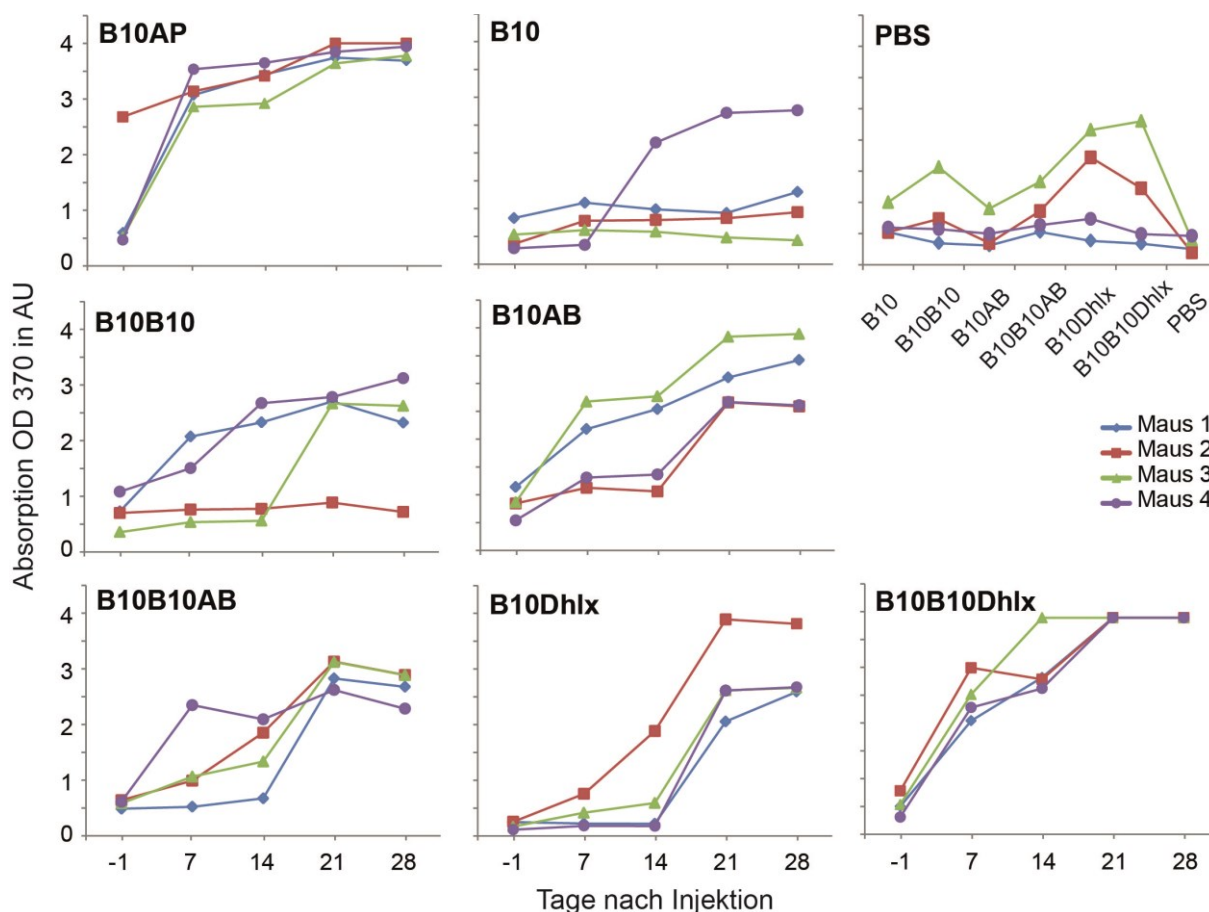


Abbildung 25: Immunogenität aller B10-Antikörper in NMRI Mäusen. Vor Injektion von je 3 nmol des B10-Formats bzw. PBS wurde von jeder Maus (n = 4) Präimmunserum (Zeitpunkt -1) gewonnen. Anschließend wurde die Blutentnahme wöchentlich und die B10-Injektion nach 2 Wochen wiederholt. Die aus dem Blut gewonnene Seren wurden in einem ELISA auf anti-B10-Format IgG-Antikörper getestet. Dargestellt ist die Absorption über den Untersuchungszeitraum von vier Wochen pro Maus. Zur Kontrolle wurden Mausseren der mit PBS injizierten Tiere auf den B10-Antikörpern getestet.

Im Anschluss an die Detektion von anti-B10-Format IgG-Antikörpern wurden deren Titer mittels ELISA bestimmt (vgl. Kap. 3.2.). Dafür wurden die Mausseren vom Tag 28 so weit verdünnt, dass das Absorptionssignal der Proben unterhalb der Detektionsgrenze von 0,5 AU lag. Diese Grenze wurde durch die zahlreichen Negativkontrollen und deren Signale im ELISA festgelegt. Die letzte Verdün-

nung, bevor die Detektionsgrenze erreicht wird, entspricht dem Antikörpertiter (Tab. 20). Bei B10AP, B10B10, B10AB und B10B10Dhlx wurden nur drei Mausseren untersucht, für alle anderen Seren wurden vier Stichproben zur Bestimmung des Titers verwendet.

Tabelle 20: Bestimmung des Titers der anti-B10-Format-Antikörper im Mausserum. Es wurden pro zu testenden B10-Konstrukt vier bzw., bei den mit * markierten Titern, 3 Seren von verschiedenen Mäusen verwendet.

B10-Format	Titer
B10	500
B10AP	10000*
B10B10	500*
B10AB	20000*
B10B10AB	5000
B10Dhlx	2000
B10B10Dhlx	50000*

Nach der Auswertung der verschiedenen ELISA-Daten wurde für B10 bzw. B10B10 immunisierte Mäuse der niedrigste Antikörpertiter mit 500 bestimmt. Diese Werte liegen deutlich unter dem Titer von 10000, der in einem früheren Test für B10AP-Serum ermittelt wurde (siehe Kap. 3.2.). Die Titer von anti-B10Dhlx IgG-Antikörpern mit 2000 und anti-B10B10AB Antikörpern mit 5000 liegen ebenfalls unterhalb des Titers von B10AP-immunisierten Tieren, sind jedoch deutlich erhöht im Vergleich zu den Konzentrationen von anti-B10 bzw. B10B10 IgG-Antikörpern. Lediglich in B10AB bzw. B10B10Dhlx-Serum wurde ein, im Vergleich zu B10AP-Serum, zweifach bzw. fünffach erhöhter Titer ermittelt.

Die weiteren Experimente sollten anhand eines der B10-Formate fortgesetzt werden. Dazu wurde ein B10-Antikörper mit möglichst hoher Affinität für Amyloidfibrillen und niedriger Immunogenität verwendet. B10B10 überzeugte als einziges neuartiges B10-Konstrukt mit der Bildung einer geringen Zahl von anti-B10B10 IgG-Antikörpern und sollte im AA-Amyloidose-Mausmodell für die Bildung getestet werden.

3.6 Etablierung des AA-Amyloidose-Mausmodells für die *in vivo* Charakterisierung neu generierter B10-Antikörperformate

Das durch Silbernitrat induzierte AA-Amyloidose-Mausmodell ist ein durch Prof. Gunilla Westermark (Uppsala, Schweden) entwickeltes *in vivo* Modell zur kontrollierten Induktion und Untersuchung von

einer systemischen AA-Amyloidose (Johan et al. 1998). Um ein Bildgebungsverfahren für die AA-Amyloidose zu entwickeln, sollte zunächst das AA-Mausmodell am HKI Jena etabliert werden.

Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer systemischen AA-Amyloidose ist das Vorhandensein einer chronischen Entzündungsreaktion. Dazu wurde in weiblichen NMRI Mäusen, durch eine subkutane Injektion von 200 µl einer 1% (w/v) Silbernitratlösung und einer zusätzlichen intravenösen 100 µl Injektion einer 1 mg/ml Milzextrakt enthaltenden AEF-Suspension, an Tag 0 eine AA-Amyloidose induziert (Abb. 26). Die Silbernitratinjektion wurde an Tag 7 und 14 wiederholt. Um den Verlauf der Ausbildung der AA-Amyloidose zu analysieren wurden nach zwei, neun und 16 Tagen jeweils Tiere zur Organ und Blutentnahme euthanasiert.

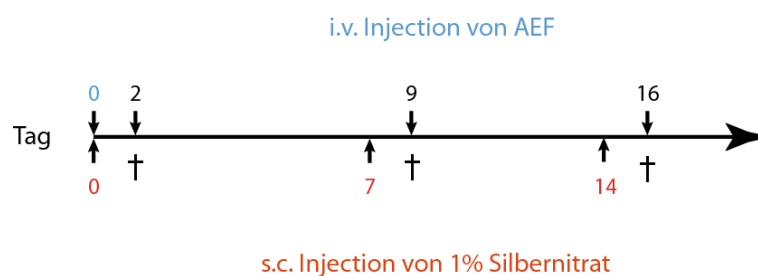


Abbildung 26: Zeitschema zur Induktion einer AA-Amyloidose in Mäusen. Zu Beginn wurden den Tieren 100 µg AEF i.v. injiziert. Zusätzlich wurden 200 µl einer 1 %-igen Silbernitratlösung subkutan verabreicht. Diese Injektion wurde wöchentlich wiederholt. Zwei Tage nach einer Injektion wurden Tiere auf die Ausbildung einer Amyloidose untersucht.

3.6.1 Im Blutserum der Mäuse wurde eine erhöhte SAA-Konzentration festgestellt

Mithilfe eines kommerziellen ELISA Kits wurde die SAA-Konzentration im Serum der oben beschriebenen induzierten Mäuse bestimmt (Abb. 27). Ein bis zwei Tage nach der ersten Silbernitratinjektion (*post injection*, p.i.) wurde eine bis zu 10-fach erhöhte Konzentration von SAA, im Vergleich zu fünf bis sechs Tagen p.i., in der Maus beobachtet. Dieser Unterschied in der SAA-Konzentration konnte ebenfalls nach der zweiten Injektion beobachtet werden. Nach der dritten Silbernitratinjektion wurde erneut nach einem Abfall der SAA-Konzentration auf ca. 1 mg/ml ein deutlicher Anstieg auf ca. 10 mg/ml detektiert.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass Silbernitrat ein bis zwei Tage p.i. zu einer Erhöhung der SAA-Konzentration im Blut der Mäuse führt. Dies wurde auch in einer Studie von Glojnaric et al. (2007) beobachtet. Fünf Tage p.i. fällt die SAA-Serumkonzentration auf ein niedriges Niveau ab. Möglicherweise setzt Silbernitrat nur einen kurzen inflammatorischen Stimulus, der nicht aufrechterhalten wird, oder es kommt zur Aggregation von SAA als Amyloidfibrillen im Gewebe.

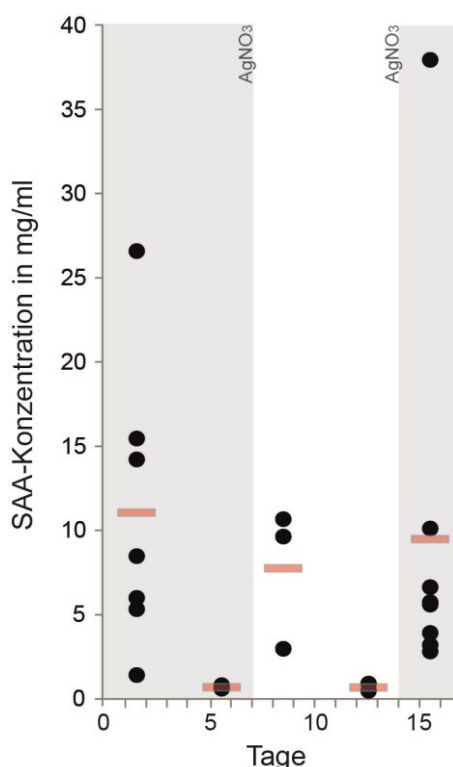


Abbildung 27: Die Blutserumkonzentration von SAA in AA-Amyloidose-induzierten Mäusen. Die SAA-Konzentration ist ein bis zwei Tage p.i. ($n = 3 - 8$) deutlich erhöht im Vergleich zum Zeitraum 5 bis 6 Tage p.i. ($n = 2 - 3$). Trotz der großen Varianz innerhalb einer Gruppe wird der Unterschied beim Vergleich der Mittelwerte (rote Markierung) deutlich. Die Varianz wurde durch die genetische Vielfalt innerhalb der NMRI-Mauspopulation erklärt, die eine unterschiedlich intensive Immunantwort durch den mit Silbernitrat gesetzten Entzündungsstimulus verursacht.

3.6.2 Die Tiere entwickelten innerhalb von zwei Wochen den höchsten Grad der Amyloidose

Um den Amyloidgehalt in Leber, Milz und Nieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion analysieren zu können, wurden die Organe mittels Kongorotfärbung nach Puchtler et al. (1962) untersucht. Der Grad der Amyloidose wurde in Anlehnung an das Bewertungssystem von Lundmark et al. (2002) qualitativ analysiert (s. 2.2.24). In den Versuchen wurden bereits nach der ersten Injektion von Silbernitrat und AEF vereinzelt erste Amyloidablagerungen (+1) in Leber und Milz mittels Kongorotfärbung nachgewiesen. Nach weiteren sieben Tagen nahm der Grad der Amyloidose weiter zu (+3), woraufhin 16 Tage nach Versuchsbeginn der höchste Amyloidosegrad (+4) erreicht wurde.

Tabelle 21: Durch AEF und Silbernitratinjektionen hervorgerufener relativer Amyloidgehalt in der Milz und Leber der Versuchstiere. Der Gehalt wird auf einer Skala von 0-4 eingeteilt (Lundmark *et al.* 2002), wobei die Stufe 0 für keine Ablagerung und Stufe 4 für die höchste Menge an Amyloidablagerungen steht.

Anzahl der Mäuse	Tage nach Injektion	Injektionen AgNO ₃	Durchschnittlicher Amyloidgehalt
10	1-6	1	0 bis +1
5	8-12	2	+3
8	16	3	+4

Nach drei Injektionen von Silbernitrat wurden in der Milz deutlich erkennbare Amyloidablagerungen in der Marginalzone der weißen Pulpa, sowie in der roten Pulpa gezeigt (Abb. 28 A/B). In der Leber sind diese Ablagerungen in der Portalzone zu erkennen (Abb. 28 C/D). Zusätzlich wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen murines SAA gezeigt, dass es sich bei den mittels Kongorot detektierten Fibrillen um SAA-Fibrillen handelt (Abb. 29 E/F). In den Nieren konnten mittels Kongorot und immunhistologischen Methoden keine Amyloidablagerungen detektiert werden.

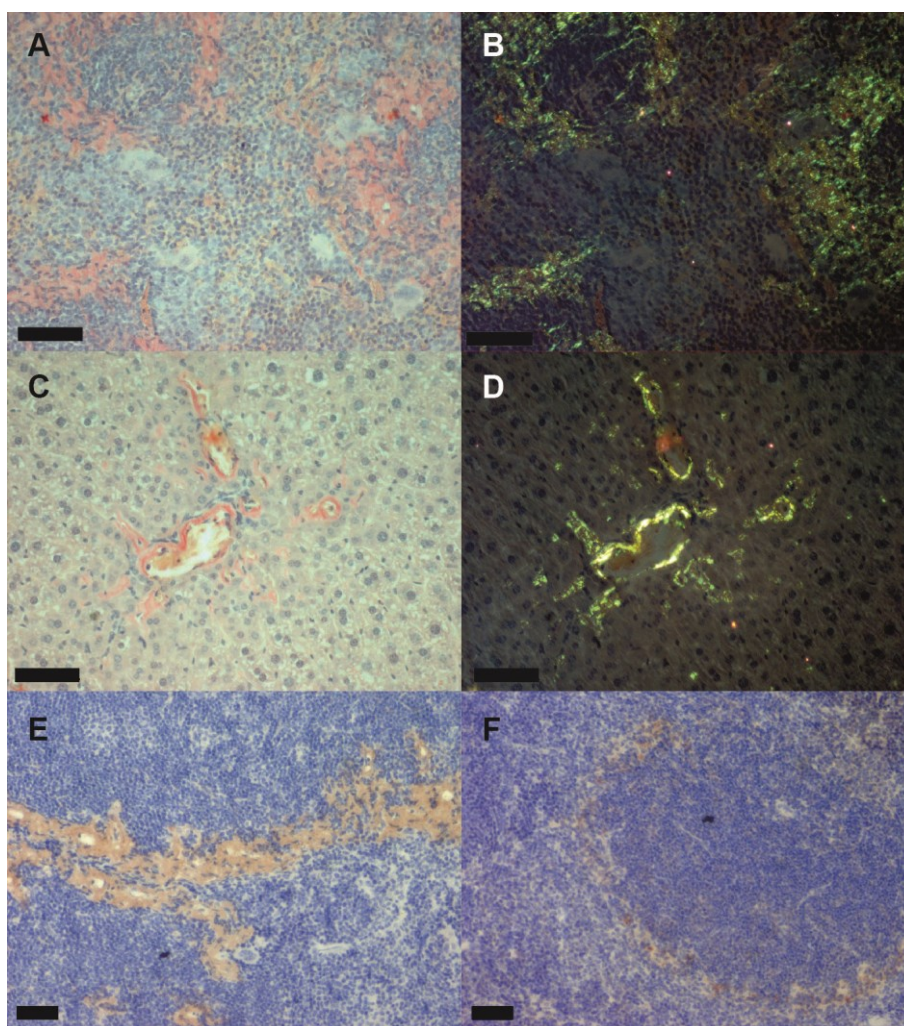


Abbildung 28: Starke Amyloidablagerungen in murinem Milz- (A,B,E,F) und Lebergewebe (C,D). Die Fibrillen (weiße Pfeile) erscheinen bei Kongorotfärbung im Hellfeld (A,C) als rote und im polarisierten Licht (B,D) als grün schimmernde Ablagerungen. Immunhistochemische Färbung mit polyklonalem anti-SAA Antikörper (E,F) wiesen die AA-Amyloidfibrillen nach 16 (E) bzw. nach 2 (F) Tagen spezifisch nach. Der Maßstab repräsentiert 50 µm.

Der Grad der Amyloidose war unabhängig von der zu diesem Zeitpunkt gemessenen SAA-Konzentration (Abb. 28). Diese war bereits nach der ersten Silbernitratinjektion sehr hoch (Abb. 27). Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt kaum Amyloid histologisch nachweisbar (Tab. 21). Erst nach weiteren

Silbernitratinjektionen mit erneut hohen SAA-Konzentrationen wurden starke Amyloidablagerungen beobachtet.

Eine Induktion der Amyloidose mithilfe von Silbernitrat und amyloidogenem Milzextrakt (AEF) in NMRI Mäusen wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde nach 16 Tagen stets Grad +4 der Amyloidbelastung in Milz und Leber erreicht. Die gewonnenen Daten waren somit vergleichbar mit den publizierten Daten der Gruppe von Prof. Gunilla Westermarck (Johan et al. 1998). Das AA-Amyloidose-Mausmodell konnte erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden und diente als Grundlage für weitere Untersuchungen.

3.7 *In situ* Bildgebung der AA-Amyloidose mithilfe des B10B10 Antikörpers

Da B10B10 die niedrigste Immunogenität unter den neu hergestellten B10-Formaten besitzt und gleichzeitig gute Bindeeigenschaften aufwies, wurde es für den Einsatz im Mausmodell der AA-Amyloidose ausgewählt. Diese Experimente sollten Aussagen zur Serumhalbwertszeit und der Verteilung von B10B10 im Organismus liefern. Außerdem sollte die Funktionsfähigkeit des entwickelten Detektionssystems im PET/CT nachgewiesen, sowie eine Aussage über die Amyloidbelastung in den Organen der Mäuse getroffen werden. Grundlage für die *in situ* Untersuchungen des B10-Konstrukts war das zuvor beschriebene AA-Amyloidose-Mausmodell. Um die Funktionsfähigkeit des B10B10 zu analysieren wurde die Amyloidose über 16 Tage induziert (siehe 3.6.). Tiere, die als Negativkontrolle dienten, bekamen im gleichen Zeitraum PBS injiziert.

3.7.1 Radioaktive Markierung von B10B10 mit Desferrioxamin und Zirkonium-89

Bevor der B10B10-Antikörper im AA-Amyloidose-Mausmodell für die Bildgebung mittels PET/CT eingesetzt werden konnte, wurde er mit dem Chelator *p*-isothiocyanatobenzyl-Desferrioxamin (DFO) markiert (siehe 2.2.11). DFO ist ein seit mehreren Jahren klinisch erprobter Chelator für die Anwendung in der PET/CT (Börjesson et al. 2006, Walter et al. 2011), der eine sehr niedrige Immunogenität besitzt (Börjesson et al. 2006). Zur Markierung wird ein *p*-Isothiocyanatobenzyl-DFO-Derivat hergestellt, das direkt mit der Aminogruppe der Lysinseitenketten des Antikörpers unter basischen Bedingungen reagiert (Fischer et al. 2013, Abb. 30C). Der Markierungsgrad von B10B10 mit DFO wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt (Abb. 29). Dabei wurden ca. 60 % unmarkierter, ca. 30 % einfach markierter und ca. 10 % zweifach DFO-markierter Antikörper nachgewiesen. Dadurch ergab sich ein mittlerer Markierungsgrad von 0,5 (Verhältnis DFO zu B10B10). Dieses Verhältnis wurde als geeignet eingestuft, da eine mögliche sterische Hinderung des Antikörpers durch Mehrfachmarkierung mit DFO vermieden werden sollte.

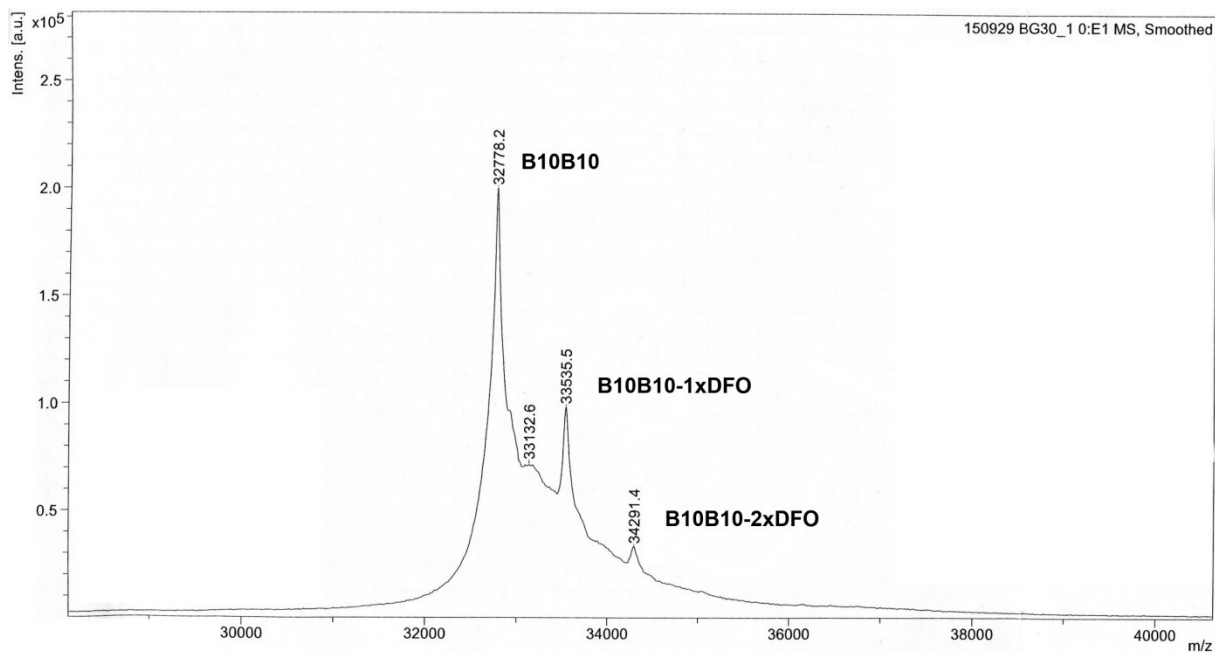


Abbildung 29: Massenspektrometrische Analyse des mit *p*-isothiocyanatobenzyl-Desferrioxamin (DFO) markierten B10B10. Unmarkierter B10B10 einer Größe von 32778 Da entspricht ca. 60 % der Probe. Einfach markierter B10B10-DFO (33535 Da) hat einen Anteil von 30 % und zweifach markierter B10B10-2DFO (34291 Da) von 10 % der Gesamtprobe. Das entspricht einem mittleren Markierungsgrad von 0,5.

Insgesamt beinhaltet die B10B10-Sequenz 15 Lysine (Abb. 30 A), die potentiell durch DFO markiert werden könnten. Zwei der Lysine befinden sich innerhalb einer CDR (gelb markiert). Um eine Einschränkung der Bindung zwischen B10B10 und den Amyloidfibrillen durch die Markierung mit DFO auszuschließen, wurde diese Bindung in einem Spot Blot mit SAA- und A β (1-40)-Fibrillen untersucht. Nach der densitometrischen Auswertung des Spot Blots konnte für den DFO-markierten B10B10 ca. 87 % (A β (1-40)) bzw. 81 % (SAA) des relativen Grauwertes im Vergleich zum unmarkierten B10B10 ermittelt werden. Die Markierung des Antikörpers mit DFO hatte somit nur einen geringen Einfluss auf die Bindung von Amyloidfibrillen.

Nach erfolgreicher Markierung des B10B10 mit DFO wurde der Antikörper für die Injektion in die Mäuse mit ca. 5,3 MBq ^{89}Zr vorbereitet. Zirkonium-89 wird durch DFO komplexiert und ist mit einer Halbwertszeit von ca. 3,3 Tagen ein ideales Isotop zur Markierung monoklonaler Antikörper, die ebenfalls eine Halbwertszeit von mehreren Tagen haben können (Meijs et al. 1997). Diese Radiomarkierung wurde mithilfe von Chromatographie-Teststreifen für monoklonale Antikörper evaluiert. Diese Teststreifen wurden nach Probenauftrag in eine 0,9 %- NaCl- Lösung gestellt bis die Lauffront die entsprechende Linie auf dem Teststreifen erreicht hat. Anschließend wurde der Streifen in zwei Teile zerschnitten und einzeln mit einem Gammazähler ausgelesen. Dabei konnte der Anteil radioaktiv markierten Antikörpers mit 99,97 % bestimmt werden. Lediglich 0,03 % freies Zirkonium war nach

der Markierungsreaktion vorhanden. Bei einem Markierungsgrad von 0,5 bedeutet das, dass die Hälfte aller eingesetzten Antikörper radioaktiv markiert vorliegt.

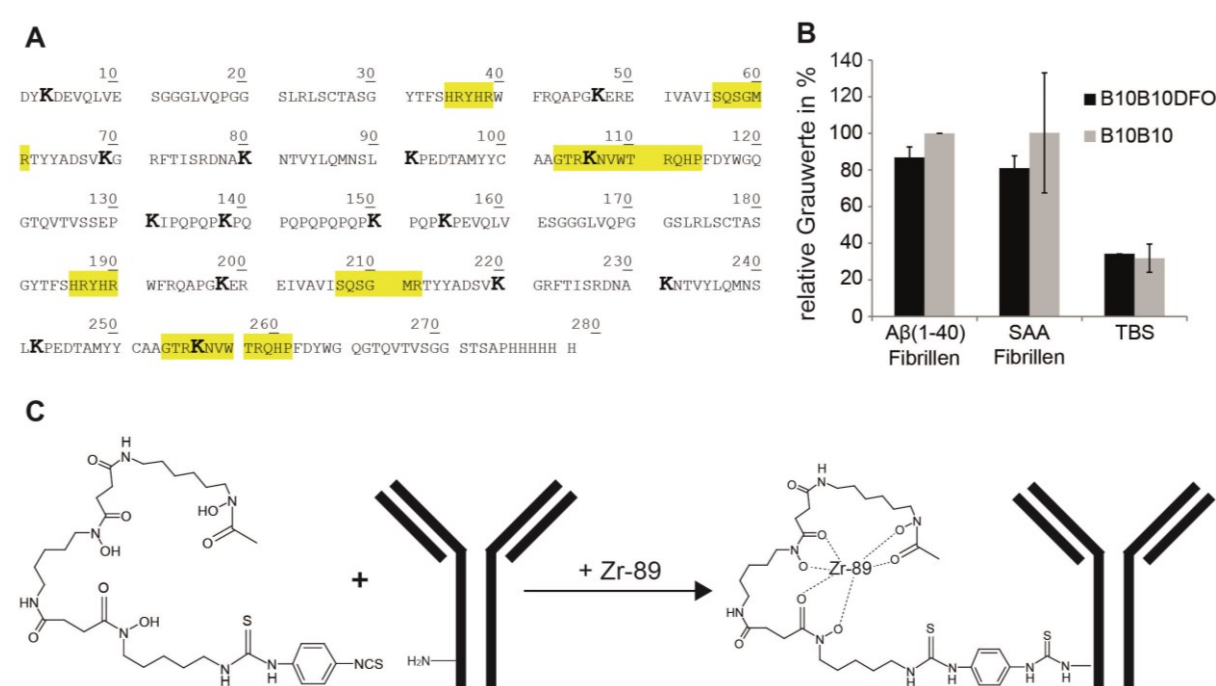


Abbildung 30: Kopplung des *p*-isothiocyanatobenzyl-Desferrioxamin (DFO) an B10B10 und anschließende radioaktive Markierung mit Zirkonium-89. Die Markierung (C) erfolgte über die Lysinseitenketten des Antikörpers (modifiziert nach Perk et al. 2010). Da B10B10 (A) auch Lysine in den CDR (gelb) aufweist, wurde B10B10 in einem Spot Blot auf dessen Funktionalität nach der Markierung mit DFO untersucht (B). Dargestellt sind die relativen Grauwerte nach einer densitometrischen Auswertung des Spot Blots (Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 2$)).

3.7.2 Detektion der AA-Amyloidose durch B10B10 im Silbernitrat-Induktionsmodell ohne die Verwendung von Kontrastmitteln

In einem ersten Versuch zur Bildgebung der AA-Amyloidose mittels B10B10 erhielten sieben Tiere eine i.v. Injektion mit rund 4,2 MBq B10B10-DFO- ^{89}Zr . Dabei wurde in fünf Tieren zuvor über 16 Tage eine AA-Amyloidose induziert und zwei Tiere dienten als Kontrolle, die im selben Zeitraum PBS injiziert bekamen. Die Verteilung des Antikörpers im Organismus wurde mittels PET/CT untersucht. Diese Messungen wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach Injektion des Antikörpers in Amyloid-belastete und gesunde Mäuse durchgeführt (Abb. 31).

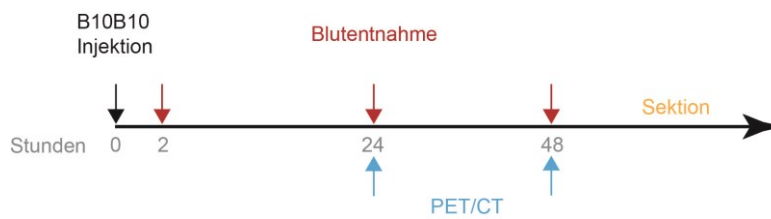


Abbildung 31: Versuchszeitplan zum ersten Versuch der Bildgebung von AA-Amyloidose in Mäusen mithilfe von B10B10. Insgesamt sieben Tieren mit AA-Amyloidose und zwei PBS-Mäusen wurde zum Zeitpunkt 0 radioaktiv markiertes B10B10 injiziert. Zwei, 24 und 48 Stunden nach der Injektion wurde den Tieren Blut entnommen und auf Radioaktivität untersucht. PET/CT-Messungen von jedem Tier wurden 24 und 48 Stunden nach der Injektion des Antikörpers durchgeführt. Nach der letzten Messung wurden alle Tiere getötet und ihre Milz und Nieren entnommen, um diese auf enthaltene Radioaktivität zu untersuchen.

Bei allen PET/CT-Messungen war sowohl in den AA-Amyloidose-Mäusen, als auch in den PBS-Kontrollmäusen bereits nach 24 Stunden ein deutliches Messsignal im Bereich der Leber und zum Teil in den Nieren zu beobachten. Nach 48 Stunden konnte keine deutliche Signaländerung verzeichnet werden. Die genaue Zuordnung des PET-Signals zu einem bestimmten Organ mittels CT war schwer möglich. Milz, Leber und Nieren konnten lediglich über das PET-Signal zugeordnet werden. Die Messsignale in Leber und Milz wiesen keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Tieren auf. Die Nieren der PBS-Tiere zeigten hingegen v.a. 48 Stunden p.i. ein leicht erhöhtes Signal im Vergleich zu den mit AA-Amyloidose-induzierten Mäusen auf, was auf eine schnellere Exkretion des Antikörpers in PBS-Tieren hindeutet. Diese Beobachtungen zur spezifischen biologischen Verteilung (*biodistribution*) von B10B10 konnte durch die Bestimmung der Radioaktivität in Milz und Nieren mithilfe der Bohrlochmessmethode (Abb. 33) nach der letzten PET/CT-Messung bestätigt werden.

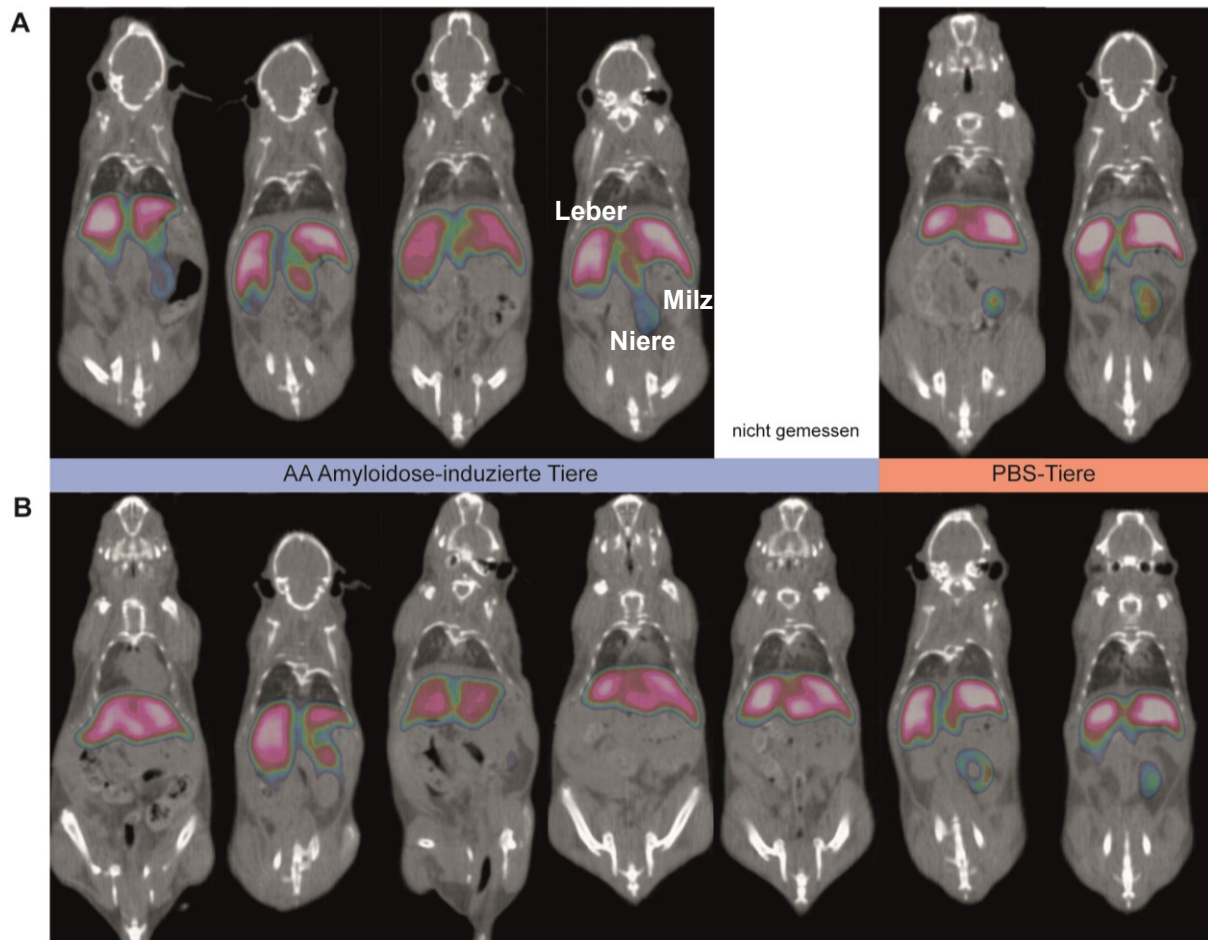


Abbildung 32: PET/CT-Messungen zur Darstellung der Verteilung des radioaktiven B10B10 in AA-Amyloidose-induzierten Mäusen und PBS-Mäusen. Den Tieren wurde mit ^{89}Zr -markierter B10B10 injiziert und zum Zeitpunkt 24 h (A) und 48 h (B) p.i. vermessen. Es konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Aufnahme des Antikörpers in Leber und Milz beobachtet werden. Lediglich bei der Aufnahme in die Niere wiesen die PBS-Tiere ein leicht erhöhtes Messsignal auf.

Dazu wurden die Mäuse euthanasiert, die Organe entnommen und deren Radioaktivität mittels Bohrlochmessung bestimmt. Die ermittelten Daten wurden Gewichts-, Halbwertszeit- und auf die injizierte Aktivität normiert (Abb. 33). Dabei zeigte sich, trotz großer Varianz von Tier zu Tier, kein deutlicher Unterschied in der Milz von PBS-Tieren und mit AA-Amyloidose assoziierten Mäusen. In den Nieren von PBS-Tieren konnte ein leicht erhöhter gemittelter Radioaktivitätsmesswert im Vergleich zu der erkrankten Versuchsgruppe beobachtet werden. Durch die sehr geringe Stichprobenzahl von $n = 2$ und die große Differenz zwischen den beiden Werten wird die Bewertung der Daten erschwert. In beiden Versuchsgruppen wurde mehr Antikörper in den Nieren, als in den Milzen nachgewiesen, was ein Zeichen für eine schnelle Ausscheidung sein kann. In einem weiteren Schritt sollten diese Ergebnisse durch eine histologische Auswertung verifiziert werden.

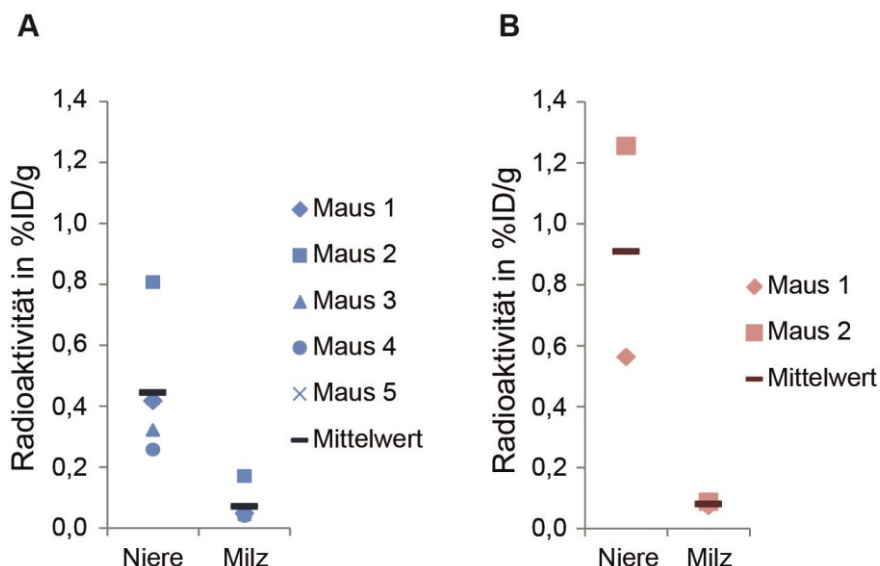


Abbildung 33: Verteilung des radioaktiv markierten B10B10 in den Nieren und der Milz von AA-Amyloidose-induzierten (A) und PBS-Mäusen (B). In den Nieren wurde in allen Tieren deutlich mehr Antikörper detektiert, als in der Milz. Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich die Werte unwesentlich. Dargestellt sind die Gewicht-, Halbwertszeit- und Aktivitätsnormierten Bohrloch-Messdaten.

Die entnommenen Organe wurden zum einen auf die Ausbildung einer AA-Amyloidose mittels Kongorotfärbung und zum anderen zur Kolo-kalisation von Amyloidablagerungen und dem radioaktiv markierten B10B10 untersucht. Dabei wurde die Ausbildung einer AA-Amyloidose (Amyloidgrad +4) in allen induzierten Tieren mittels Kongorot-Färbung nachgewiesen. Für die Kolo-kalisation von Amyloidfibrillen und Antikörper wurden Teile der Leber und der Milz eingefroren und geschnitten. Diese Schnitte wurden, zum Nachweis des radioaktiv markierten B10B10 in den Organen mithilfe von Autoradiographie auf Ilford Emulsions bedeckte Objektträger aufgezogen. Nach siebentägiger Inkubation wurden die Schnitte entwickelt, fixiert und anschließend mit Hämatoxylin und Kongorot gefärbt. Bei der Autoradiographie wird die Anwesenheit des mit Zirkonium-89 radioaktiv markierten Antikörpers durch die Bildung von Silbersalzen visualisiert. Diese sind in histologischen Schnitten als schwarze Punkte zu erkennen. In Abb. 34 A sind intensive schwarze Ablagerungen um den Glisson-Trias des Periportalfelds, bestehend aus Pfortader, kleinem Gallengang und der Leberarterie, und in den Lebersinusoiden zu erkennen. Außerdem erkennt man an gleicher Stelle rot eingefärbte Areale. Diese Bereiche sind im Dunkelfeld als grün-gelbe Doppelbrechungen zu erkennen, welche auf fibrilläre Ablagerungen in den durch den Antikörper ebenfalls markierten Bereichen hinweisen. In den PBS-Mäusen (Abb. 34 E und F) sind im Vergleich zu den mit AA-Amyloidose-induzierten Tieren, nur sehr geringe Silberfärbungen zu erkennen. Ähnliches konnte in der Milz beobachtet werden, wo sich die Amyloidablagerungen in der Marginalzone und der Perifollikulären Zone befinden. Es konnte eine spezifische Bindung von B10B10 an Amyloidfibrillen im Leber- und Milzgewebe nachgewiesen werden.

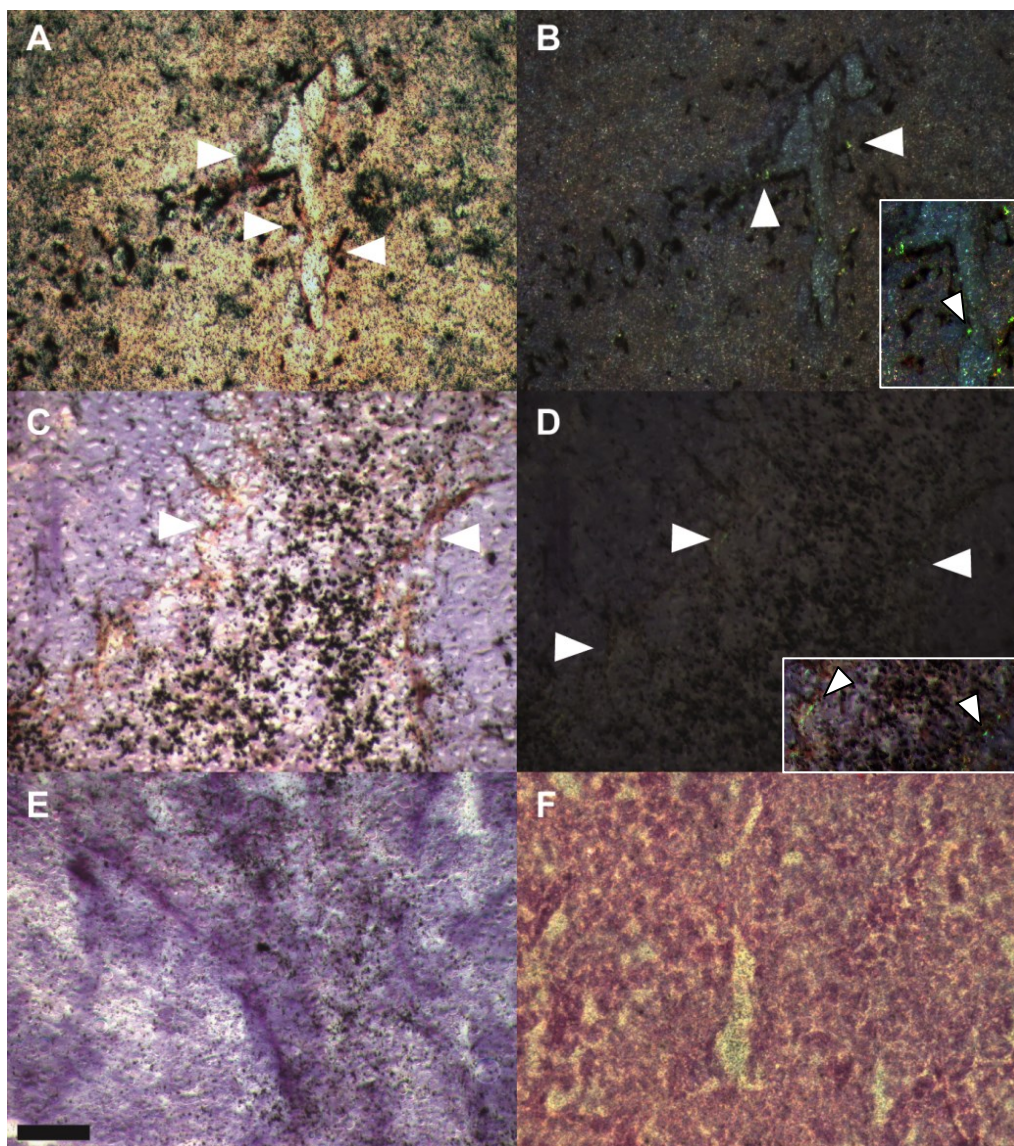


Abbildung 34: Histologische Untersuchung zur Kolo-kalisation von radioaktivem B10B10 und Kongorot. In Amyloid-belasteter Leber (A,B) und Milz (C,D) sind starke Silberablagerungen, durch den vorhandenen radioaktiven B10B10, und gleichzeitige Kongorotfärbung (weiße Pfeile) nachweisbar. Derartige Färbungen sind jedoch nicht in PBS-Kontrollmäusen (Milz E, Leber F) zu erkennen. Der Maßstab repräsentiert 50 µm.

Zur Bestimmung der Serumhalbwertszeit des B10B10, wurden zwei, 24 und 48 Stunden nach der Injektion des radioaktiven Antikörpers jeder Maus 5 µl Blut durch Schwanzpunktion entnommen und deren Radioaktivität mithilfe der Bohrlochmessung bestimmt (Abb. 35). Dabei wurden pro Zeitpunkt fünf Messwerte für AA-Amyloidose-induzierte Tiere und zwei für PBS-Tiere aufgenommen (siehe Anhang Tab. A1). Trotz teilweise starker Varianz innerhalb der Messgruppen konnte bereits nach 24 Stunden bei den mit Amyloidose-belasteten Tieren und bei den gesunden Tieren eine deutliche Reduktion der Radioaktivität im Blut nachgewiesen werden. Nach weiteren 24 Stunden konnten vergleichbare Werte gemessen werden.

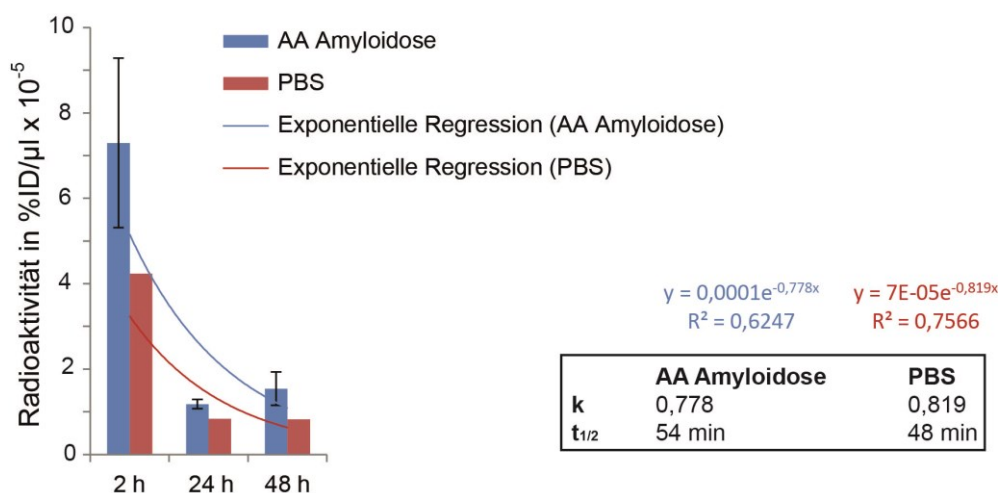


Abbildung 35: Berechnung der Serumhalbwertszeit von B10B10. Dabei wurden die mithilfe eines Bohrlochmessgerätes die Aktivität in den Blutproben gemessen, Volumen-, Halbwertszeit- und Aktivitätsnormiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (AA: n = 5; PBS: n = 2). Die ermittelte spezifische Radioaktivität des Antikörpers war im Blut von AA-Amyloidose Mäusen (blau) und PBS-Mäusen (rot) ähnlich. Die Halbwertszeitkonstante k wurde der exponentiellen Gleichung der Trendlinie entnommen und zur Berechnung der Halbwertszeit über $t_{1/2} = \ln 2/k$ verwendet.

Ausgehend von einer Kinetik 1. Ordnung konnte in den Amyloidose-belasteten Tieren eine Halbwertszeit für B10B10 von 54 Minuten und in den PBS-Mäusen von 48 Minuten berechnet werden. Dafür wurden für die gemittelten Werte der einzelnen Zeitpunkte exponentielle Trendlinien berechnet und daraus die Halbwertszeitkonstante k ermittelt. Über die Gleichung $t_{1/2} = \ln 2/k$ wurde anschließend die Halbwertszeit berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Antikörper hinsichtlich seiner Serumhalbwertszeit ähnlich in gesunden und erkrankten Tieren verhält.

Durch die Kolokalisation von radioaktivem B10B10 und den Amyloidfibrillen in Leber und Milz war der histologische Nachweis zur Detektion erbracht. Außerdem konnte die Serumhalbwertszeit von B10B10 mit ca. 50 Minuten ermittelt werden. Andererseits konnte mittels PET/CT eine Anreicherung des B10B10 in Leber und teilweise auch Milz und Niere in allen Tieren gezeigt werden. Jedoch war die genaue Zuordnung von PET-Signalen zu den im CT detektierten Organen schwierig, was eine detaillierte Auswertung der PET/CT-Daten verhindert hatte. Auch bei der Bestimmung der Radioaktivität in Milz und Nieren mittels Bohrlochmessung konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen Mäusen mit einer induzierten AA-Amyloidose und PBS-Tieren detektiert werden.

Zur Überprüfung der Daten sollte der komplette Versuch ein zweites Mal durchgeführt werden. Jedoch sollten dabei einige Punkte geändert werden. Zum einen wurde eine PET/CT-Messung zwei Stunden p.i. vorgesehen, um einen besseren Einblick in die zeitliche und räumliche Verteilung des Antikörpers in der Maus ermöglichen. Um dabei die PET-Signale den CT-Daten besser zuordnen zu können, sollte ein Kontrastmittel zur verbesserten Darstellung von Milz und Leber eingesetzt werden.

Zum anderen sollte die Verteilung des Antikörpers innerhalb der Organe zu den einzelnen Zeitpunkten mittels Autoradiographie untersucht werden.

3.7.3 Detektion einer AA-Amyloidose durch B10B10 im Silbernitrat-Induktionsmodell unter Verwendung eines Kontrastmittels

Nach der Durchführung des Experiments zur Detektion einer AA-Amyloidose mithilfe des VHH-Antikörpers B10B10 wurden für den zweiten Versuch einige Parameter geändert:

- Zur besseren Abgrenzung von Milz und Leber wurde ca. eine Stunde vor der CT-Messung ein Kontrastmittel (ExiTron nano 6000) i.v. injiziert. Dadurch sollte die Möglichkeit der PET/CT-Auswertung verbessert werden.
- Um die zeitliche Verteilung des Antikörpers in der Maus besser nachvollziehen zu können, wurden für diesen Versuch die Zeitpunkte 2 h, 24 h und 48 h p.i. vorgesehen.
- Die Verwendung eines Kontrastmittels beeinflusst den CT-basierten Schwächungsscan und somit die Dichte-Korrektur der PET-Daten. Zudem führt die lange Halbwertszeit des Kontrastmittels bei mehrfacher Injektion (2 h, 24 h, 48 h p.i.) in eine Maus zu unterschiedlichen Abschwächungen der PET-Signale innerhalb des Messzeitraums, was eine Vergleichbarkeit der Zeitpunkte untereinander nicht mehr gewährleisten kann. Um diese Mehrfachinjektion zu vermeiden, wurde die Tierzahl erhöht, da jede PET/CT-Messung eine finale Messung für das entsprechende Tier darstellte.

Der weitere Versuchsaufbau entsprach dem des vorherigen Experiments.

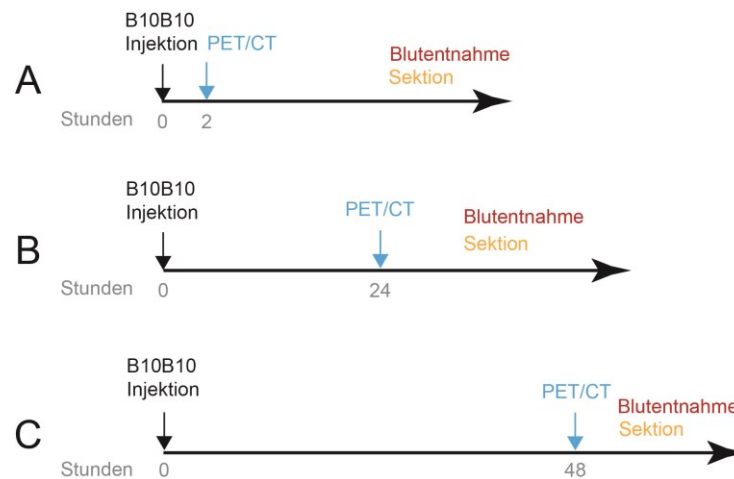


Abbildung 36: Versuchszeitplan zum zweiten Versuch der Bildgebung von AA-Amyloidose in Mäusen mithilfe von B10B10. Insgesamt wurde elf Tieren mit einer AA-Amyloidose (krank) und sechs PBS-Tieren radioaktiv markiertes B10B10 zum Zeitpunkt 0 injiziert. (A) Vier kranke Tiere und zwei PBS-Tiere wurden zwei Stunden p.i. des Antikörpers im PET/CT vermessen und anschließend getötet. Bei der Sektion wurden Blut und Organe entnommen und auf die enthaltene Radioaktivität getestet. (B) Auf dieselbe Weise wurde mit weiteren vier kranken und zwei PBS-Tieren verfahren, wobei die PET/CT-Messung nach 24 Stunden durchgeführt wurde. (C) Zum Zeitpunkt 48 Stunden p.i. wurden lediglich drei kranke und zwei gesunde Tiere mittels PET/CT vermessen und anschließend sezziert.

In diesem zweiten Versuch waren, durch die Injektion von ExiTron nano 6000, Leber und Milz deutlich besser unterscheidbar (Anhang Abb. A1). Weiterhin war durch die zusätzliche Messung zwei Stunden p.i. eine spezifischere Aussage zur Verteilung des B10B10-DFO-⁸⁹Zr in der Maus möglich, denn die Aufnahmen unterschieden sich deutlich zu denen, die 24 und 48 Stunden (Abb. 38) p.i. vermessen wurden. Nach zwei Stunden waren deutliche Unterschiede im PET bei der Verteilung des radioaktiv markierten B10B10, dargestellt durch die SUV (*Standardized Uptake Values*), in den PBS-Kontrolltieren und den Amyloid-belasteten Tieren zu erkennen. Die PBS-Tiere wiesen ein deutliches PET-Signal in der Blase, jedoch nur schwache Signale in Milz, Leber und Darm auf (Abb. 37). Das impliziert eine schnelle Ausscheidung des Antikörpers über den Harntrakt. In den Mäusen, in denen eine AA-Amyloidose induziert wurde, waren die PET-Signale in der Leber und der Milz in drei von vier Tieren stärker und das gesamte Organ betreffend (Abb. 38). Zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. nahmen die Signale in der Milz und Leber der AA-Mäuse, im Vergleich zu den Tieren, die zwei Stunden p.i. gemessen wurden, leicht ab. Im Gegensatz dazu wurde in den PBS-Tieren eine deutliche Signalzunahme in Milz und Leber detektiert. 48 Stunden p.i. konnten v.a. in der Milz beider Versuchsgruppen ähnliche Signalintensitäten nachgewiesen werden. Diese überstiegen jene von zwei Stunden p.i. deutlich.

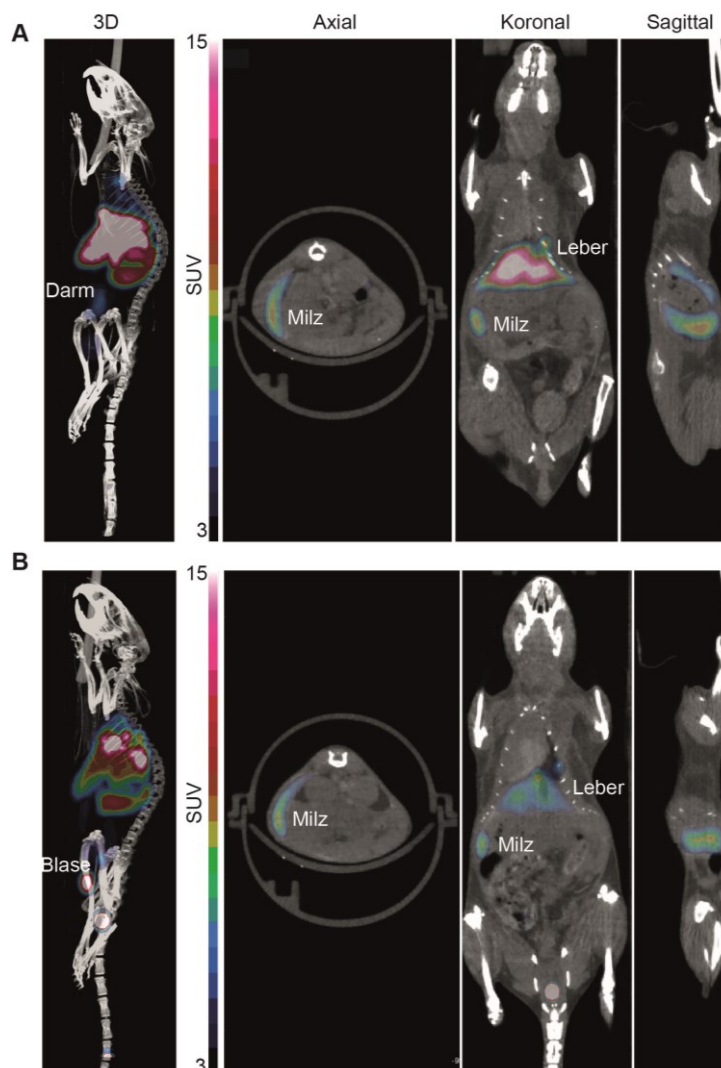


Abbildung 37: Einsatz des B10B10-DFO-⁸⁹Zr in der Bildgebung einer AA-Amyloidose. Repräsentativ sind die PET/CT-Aufnahmen und Rekonstruktionen einer mit AA-Amyloidose-belasteten (A) und einer PBS-Maus (B) zwei Stunden nach Injektion des B10B10-DFO-⁸⁹Zr dargestellt. Auffällig ist die deutliche Aufnahme des Antikörpers in die Leber und die Milz der mit AA-Amyloidose-erkrankten Maus im Vergleich zur PBS-Maus. Die PBS-Maus weist eine deutlich stärkere Ausscheidung des Antikörpers über die Blase auf.

Weiterhin konnten zwei Stunden p.i. vereinzelt Signale im Darm bei drei von vier Amyloid-belasteten Tieren beobachtet werden. Diese Beobachtungen können eine Fibrillenbindung des Antikörpers im Darmtrakt signalisieren. Die Blase wies ein, im Vergleich zu den PBS-Tieren, deutlich schwächeres Signal auf. Wahrscheinlich wurde die Ausscheidung des Antikörpers, aufgrund seiner Bindung an Amyloidfibrillen in Leber und Milz, langsamer im Vergleich zu den PBS-Tieren ausgeschieden. Im Schwanz konnte ebenfalls, unabhängig von der Versuchsgruppe, in einigen Tieren PET-Signale beobachtet werden. Diese lassen sich auf die Injektion des radioaktiv markierten Antikörpers über die Schwanzvene erklären. 24 und 48 Stunden p.i. wurden in Darm und Blase keine Antikörper nachgewiesen.

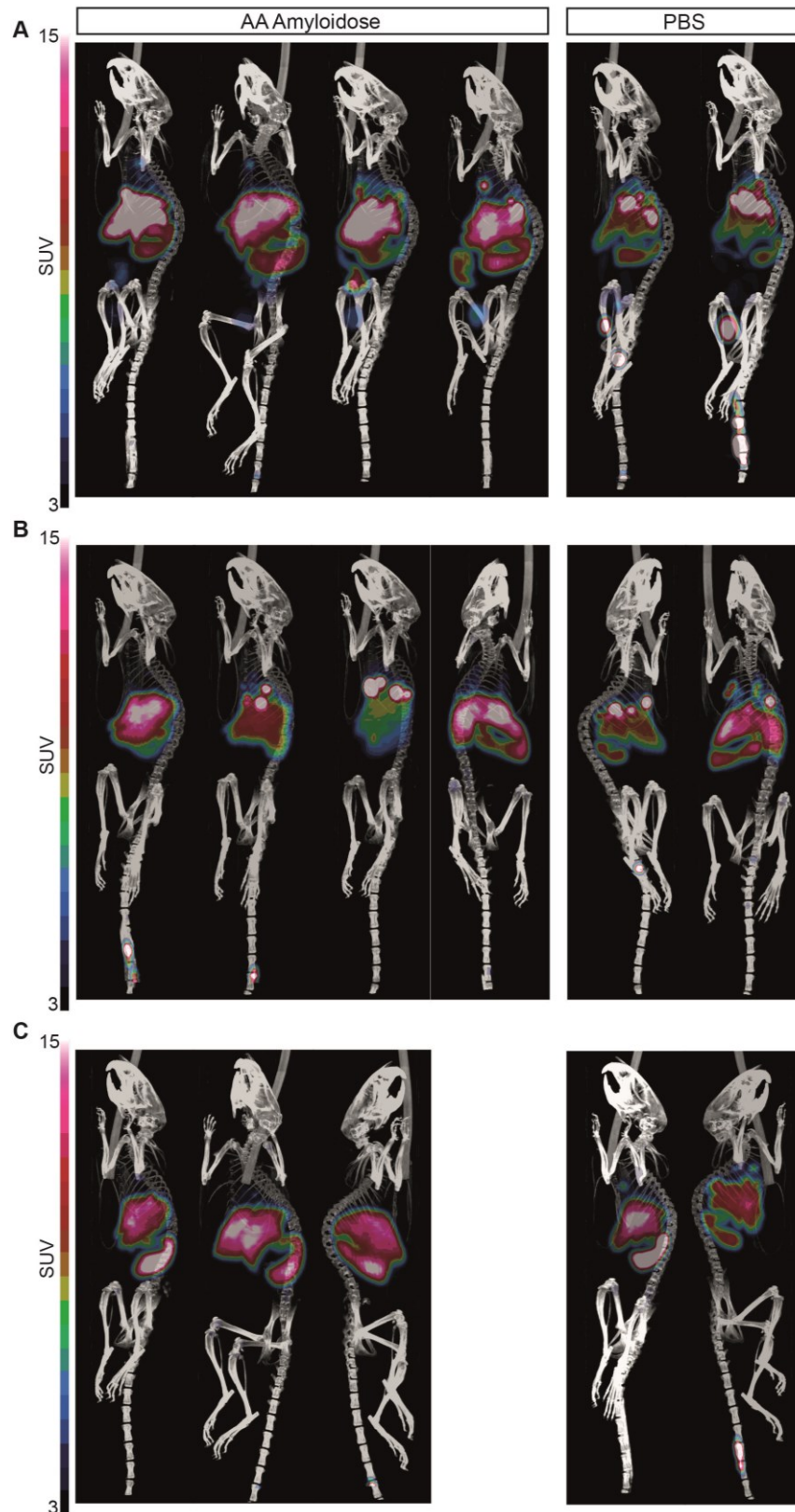


Abbildung 38: Vergleichende Bildgebung einer AA-Amyloidose über einen Zeitraum von 48 Stunden. Dazu wurden drei bis vier mit Amyloidose-belastete Tiere zwei (A), 24 (B) und 48 Stunden (C) nach Injektion des radiomarkierten B10B10 mittels PET/CT untersucht. Zur Kontrolle wurden zu jedem Zeitpunkt zwei gesunde PBS-Tiere untersucht, die ebenfalls den B10B10-Antikörper injiziert bekamen.

Die PET/CT-Daten konnten im Anschluss durch die Bestimmung der biologischen Verteilung (*biodistribution*) des Antikörpers, wie zuvor beschrieben, in Leber, Niere und Milz (Abb. 39) bestätigt werden. Für die Bestimmung der spezifischen biologischen Verteilung des radioaktiv markierten B10B10 wurde den euthanasierten Mäusen die Leber entnommen und nur ein kleiner Teil im Bohrloch vermessen. Dadurch sind, aufgrund punktueller Signale in der Leber, Unterschiede von PET/CT-Messung zur Radioaktivitätsbestimmung der biologischen Verteilung (*biodistribution*) möglich. Die ermittelte Radioaktivität wurde dann auf das gesamte Organ umgerechnet.

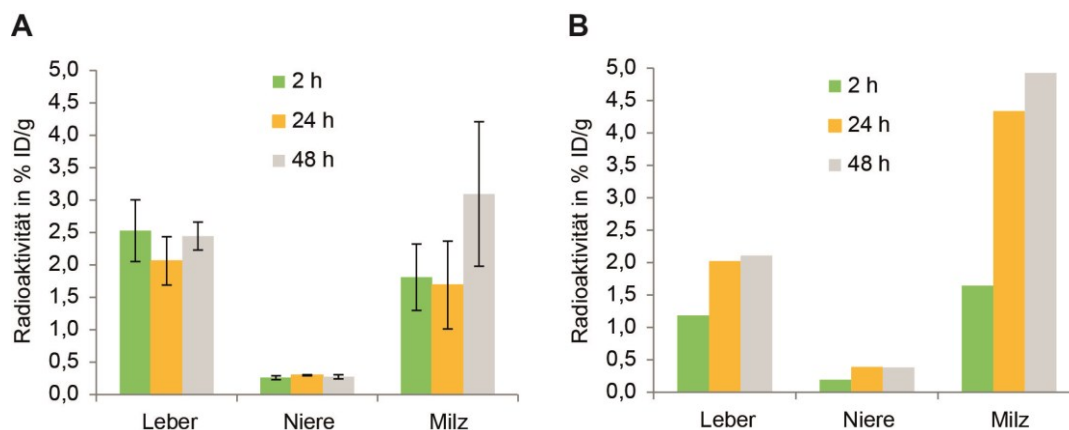


Abbildung 39: Verteilung des radioaktiv markierten B10B10 in den Nieren und der Milz von AA-Amyloidose-induzierten (A) und PBS-Mäusen (B). In den Nieren wurde deutlich weniger Antikörper detektiert als in der Milz und der Leber. Außerdem unterscheiden sich die Werte in erkrankten und gesunden (PBS) Mäusen unwesentlich. Dargestellt sind die Gewicht-, Halbwertszeit und Aktivitätsnormierten Bohrloch-Messdaten. (A: n = 4 bzw. n = 3 (48 h), B: n = 2)

Bei der Untersuchung der spezifischen biologischen Verteilung konnte zum Zeitpunkt zwei Stunden p.i. in AA-Mäusen eine höhere Radioaktivität in Leber, Niere und Milz, als in PBS-Tieren detektiert werden. 24 Stunden p.i. fiel die Radioaktivität in den Organen der mit Amyloidose belasteten Tiere leicht ab, während sie in den PBS-Tieren deutlich anstieg. Bei der Betrachtung des Zeitpunktes 48 Stunden p.i. hingegen, wurde in beiden Versuchsgruppen ein Anstieg der Radioaktivität v.a. in Leber und Milz nachgewiesen.

Generell lässt sich zusammenfassen, dass zum Zeitpunkt zwei Stunden p.i. ein Unterschied zwischen kranken und gesunden Mäusen zu erkennen ist. Der Antikörper wird in PBS-Tieren schneller ausgeschieden und bindet in Amyloidose-assoziierten Tieren stärker in Milz und Leber. Nach 24 und 48 Stunden gleichen sich die Versuchsgruppen an und es kommt, betrachtet man die Milz, sogar zu einem unerwarteten verstärkten Nachweis von Radioaktivität in der Milz von PBS-Tieren.

Nachdem die Radioaktivität der Organe ermittelt wurde, wurden Leber und Milz histologisch auf die Ausbildung von Amyloidablagerungen mittels Kongorotfärbung untersucht. Durch Autoradiographie mit diesen Gefrierschnitten wurde zusätzlich, wie zuvor beschrieben, nachgewiesen, dass B10B10 hauptsächlich in Amyloid-positiven Arealen von Milz (Marginalzone, perifollikuläre Zone) und Leber (Zentralvene) gebunden hat (Abb. 40). Die konzentrierte Silberfärbung in Leber und Milz war im Gewebe der PBS-Tiere jedoch nicht zu beobachten (Abb. 40 C/D und G/H). Außerhalb der genannten Bereiche in Leber und Milz wurde ebenfalls geringe Radioaktivität durch die typische schwarze Silbersalzbildung nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich dabei um unspezifische Bindungen des B10B10, die zum Teil auch im Gewebe der PBS-Kontrolltiere beobachtet wurden. Es konnten außerdem keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 24 h, 48 h) festgestellt werden.

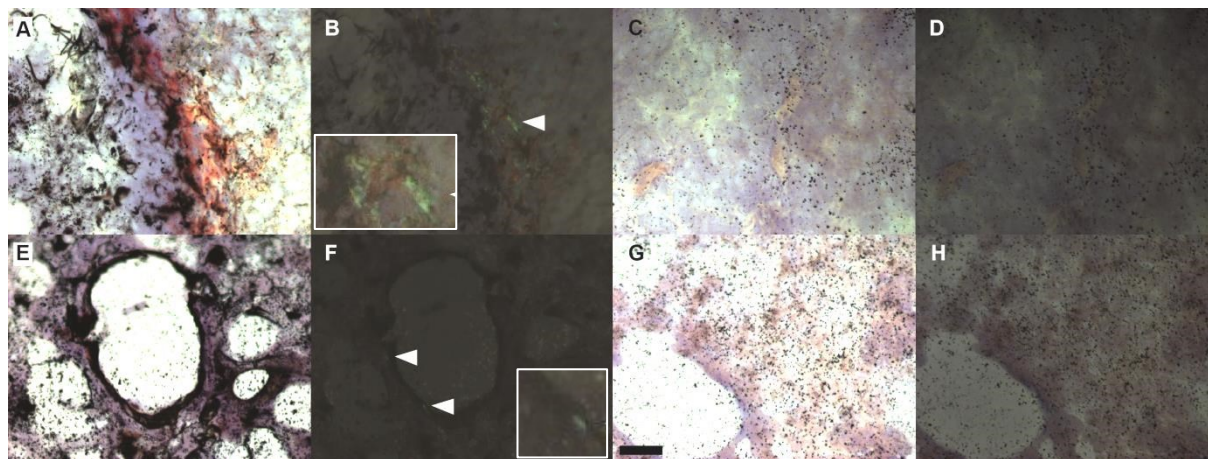


Abbildung 40: Kolokalisation von radioaktiv markiertem B10B10 mittels Silberfärbung und Amyloidablagerungen mittels Kongorot. Mit Kongorot gefärbte Amyloidfibrillen erscheinen im Hellfeld (A,C,E,G) intensiv rot und im Dunkelfeld (B,D,F,H) eines Polarisationsmikroskops grünlich (s. weiße Pfeile). In den PBS-Tieren (C,D,G,H) wurde, im Gegensatz zu denen mit AA Amyloid- belasteten (A,B,E,F), kein Amyloid nachgewiesen. Repräsentativ für alle Zeitpunkte, wurden Milz (A-D) und Leber (E-H) von Tieren die 24 Stunden nach der B10B10-Injektion seziiert wurden, dargestellt. Der Maßstab repräsentiert 50 µm.

In den Sektionen nach den PET/CT-Messungen wurde den AA- und PBS-Mäusen zwei, 24 und 48 Stunden p.i. neben den Organen zusätzlich Blut entnommen, um erneut die Serumhalbwertszeit des Antikörpers zu bestimmen. Dazu wurde das gesamte Blut, welches bei der Herzpunktion gewonnen wurde, auf die enthaltene Radioaktivität untersucht. Diese wurde auf das Volumen, die Halbwertszeit und die Anfangsaktivität normiert und in Abbildung 41 dargestellt.

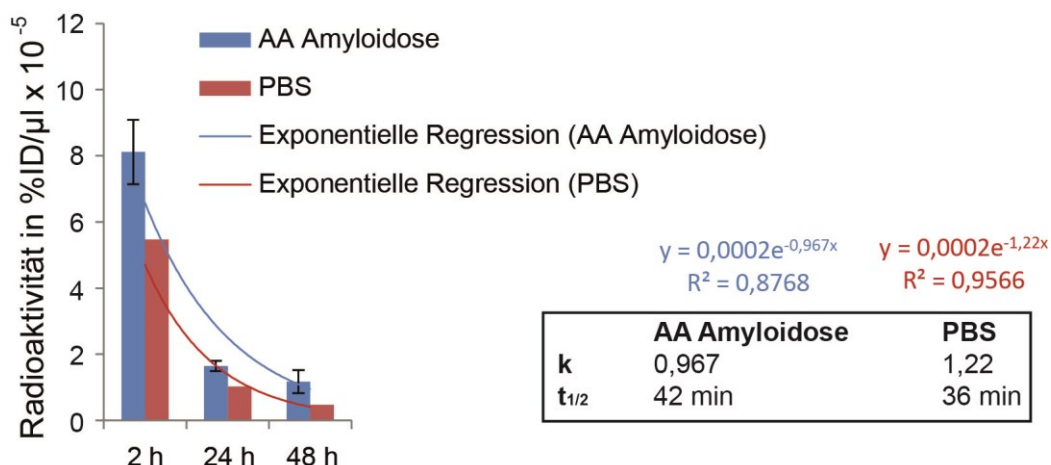


Abbildung 41: Berechnung der Serumhalbwertszeit von B10B10. Dabei wurden die Radioaktivität in den Blutproben gemessen und Volumen-, Halbwertszeit- und Aktivitätsnormiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler (AA: n = 4 (2 h, 24 h) bzw. n = 3 (48 h; PBS: n = 2)) Die ermittelte spezifische Radioaktivität im Blut von AA-Amyloidose Mäusen (blau) und PBS-Mäusen (rot) war ähnlich zueinander. Die Halbwertszeitkonstante k wurde der exponentiellen Gleichung der Trendlinie entnommen und zur Berechnung der Halbwertszeit über $t_{1/2} = \ln 2/k$ verwendet.

Erneut fällt auf, dass es nach 24 Stunden in PBS-Mäusen und den mit AA-Amyloidose-induzierten Tieren zu einer starken Abnahme der Radioaktivität im Blut kommt. Der Antikörper wurde demnach innerhalb von 24 Stunden abgebaut und über Leber und Nieren ausgeschieden oder durch Bindung im Gewebe aus dem Blut entfernt. Die Serumhalbwertszeit wurde, wie im vorangegangenen Experiment beschrieben, berechnet und in diesem Versuch mit 42 Minuten in Amyloid-assoziierten Tieren und 36 min in PBS-Tieren bestimmt.

Der komplette Versuch hat gezeigt, dass zwei Stunden nach Injektion des radioaktiv markierten B10B10 ein spezifischer Nachweis von Amyloidablagerungen in der Maus möglich ist. Zu späteren Zeitpunkten kann kein spezifischer Nachweis, aufgrund gleichstarker radioaktiver Signale in den Organen von AA- und PBS-Mäusen, erfolgen.

3.7.4 Detektion der AA-Amyloidose durch B10B10 im transgenen huIL-6 Mausmodell

Um die bisherigen Daten zu bestätigen, wurden die VHH-Antikörper B10 und B10B10 im Labor von Prof. Wall (Knoxville, Tennessee, USA) im transgenen H2/huIL-6 Mausmodell (siehe 1.2.2.) getestet. Dazu wurden die Antikörper über Tyrosinseitenketten mit Iod-125 (¹²⁵I, $t_{1/2} = 59,4$ d) markiert (Wall et al. 2006). Dabei lag der Markierungsgrad bei 0,55. Anschließend wurden die markierten Antikörper mittels SDS-PAGE analysiert und durch ein Cyclone Phosphorimager detektiert (Abb. 42). Da kein

Größenmarker verwendet werden konnte, wurden nur die relativen Größen der beiden Antikörper verglichen. B10 (15,7 kDa) wurde auf halber Laufhöhe des B10B10 (32,8 kDa) detektiert. Da diese vergleichbar zu früheren SDS-PAGE-Analysen waren, ließen sich keine Veränderungen durch die ^{125}I -Markierung hinsichtlich der Laufeigenschaften im Gel feststellen.

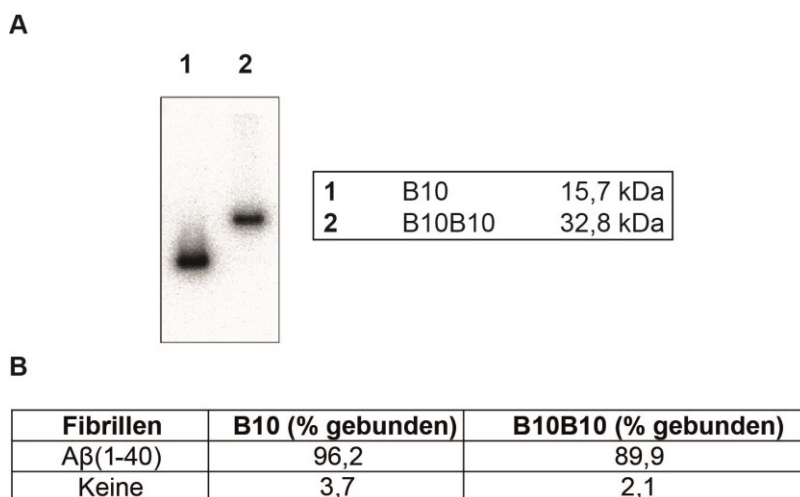


Abbildung 42: Funktionale Untersuchung von ^{125}I -B10 und ^{125}I -B10B10. (A) Die radioaktiv markierten Antikörper weisen in der SDS-PAGE zu vorhergehenden Untersuchungen gleichartige Läuflhöhen zueinander auf. (B) Die Antikörper sind nach der Iodierung in der Lage Amyloidfibrillen zu binden (*pull-down Assay*).

Zur Überprüfung der Funktionalität der VHH-Antikörper nach der Iodierung wurde ein sogenannter „*pull-down Assay*“ (Kennel et al. 2016) durchgeführt. Dazu wurden 50 μg A β (1-40)-Fibrillen mit 5 ng eines mit ca. 50000 cpm radiomarkierten B10-Antikörpers für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillen von nicht gebundenen Antikörpern durch Zentrifugation getrennt. Das erneut gewaschene Pellet wurde mithilfe eines Gammazählers auf seine Radioaktivität untersucht (Abb. 42 B). Dabei wurde festgestellt, dass 96 % bzw. 90 % der eingesetzten ^{125}I -B10 bzw. ^{125}I -B10B10 an den Amyloidfibrillen gebunden haben. Das bedeutete, dass die Iodierung der Antikörper keinen negativen Einfluss auf die Fibrillenbindung hat. Parallel wurde ein Ansatz ohne Amyloidfibrillen untersucht. Dabei wurde mit 2-4 % erwartungsgemäß eine sehr geringe Radioaktivität im Pellet gemessen. Das war ein Hinweis, dass B10 und B10B10 durch die Iodierung nicht instabilisiert werden, ausfallen oder durch die Zentrifugation sedimentiert werden.

Radioaktiv markierter B10 bzw. B10B10 wurde in acht Wochen alte transgene huIL-6 Mäuse injiziert. Die Tiere bekamen fünf Wochen vor Versuchsbeginn AEF, um eine AA-Amyloidose zu induzieren. Vier, 24 und 48 Stunden nach der Injektion der Antikörper wurden je drei Tiere *post mortem* im SPECT/CT untersucht.

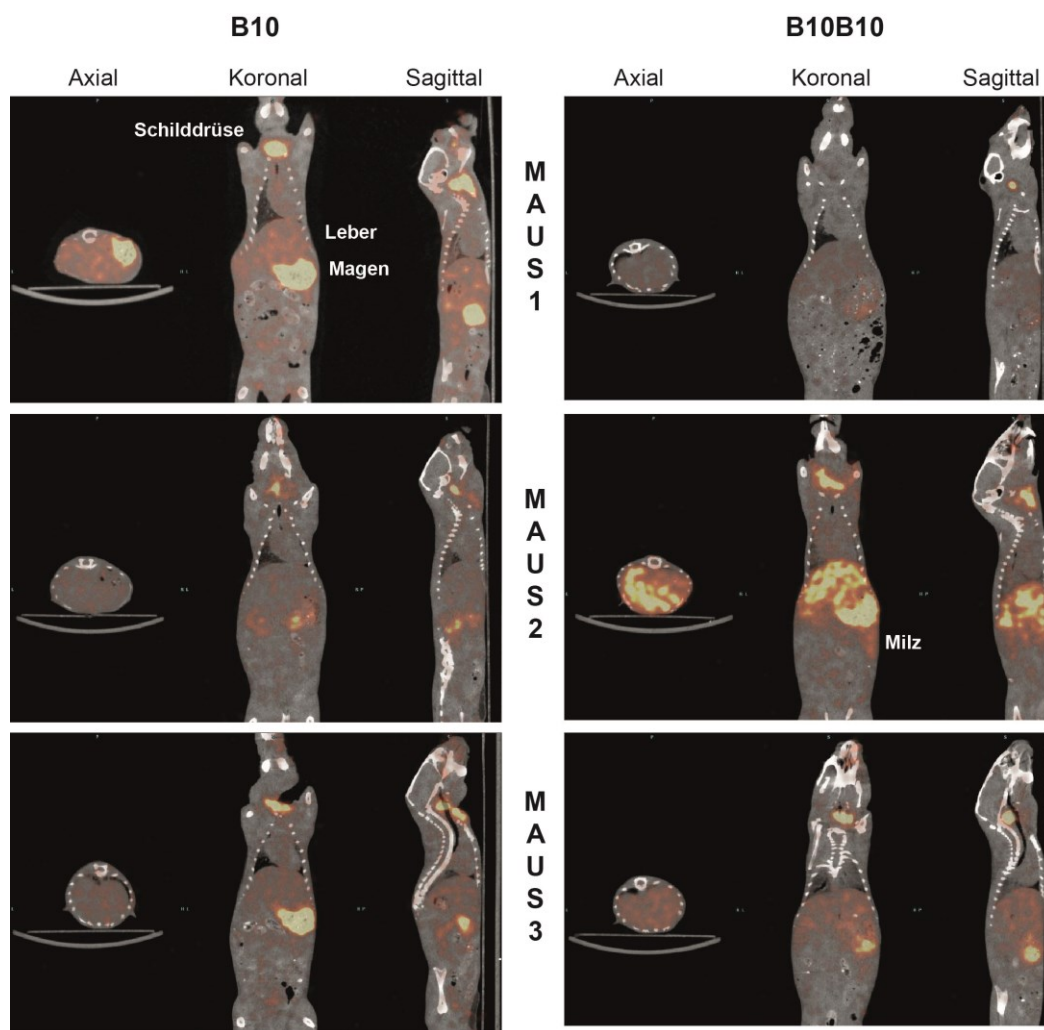


Abbildung 43: SPECT/CT Aufnahmen von huIL-6 transgenen Mäusen vier Stunden nach Injektion von ^{125}I -B10 bzw. ^{125}I -B10B10. Auffällig war die schnelle Aufnahme von Radioaktivität in Magen und Schilddrüse, was durch Dehalogenierung des Antikörpers und Einlagerung von Iodid in die genannten Organe verursacht wurde.

Bei den in diesem Experiment verwendeten Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm. Trotz dieser genetisch homogenen Tierpopulation wurde bei den SPECT/CT-Messungen und der Bestimmung der spezifischen biologischen Verteilung eine große Varianz von Tier zu Tier innerhalb einer Gruppe beobachtet. Eine ähnliche Varianz wiesen die beiden vorangegangenen Experimente mit Tieren des Auszuchtstammes NMRI auf. In diesem Versuch wurde vier Stunden nach Injektion in allen drei Tieren eine deutliche ^{125}I -B10-Aufnahme in die Leber verzeichnet. Außerdem konnte ein deutlicher Anstieg des Messsignals in der Schilddrüse und dem Magen gemessen werden. Diese Signale sind typisch für eine Dehalogenierung von Antikörpern, da sich Iodid spezifisch in diesen Organen ablagerte. ^{125}I -B10B10 verhielt sich in den Mäusen ähnlich, wobei die Varianz der Messdaten

zwischen den einzelnen Tieren deutlich größer ist (Abb. 43). Maus 2 wies die höchsten Signale in Leber, Milz und Magen auf.

Zur weiteren Untersuchung der Verteilung der Antikörper wurden die Tiere nach der Messung seziiert, elf Organe entnommen und deren Radioaktivität mittels Gammazähler bestimmt. Anhand der Daten zur biologischen Verteilung (*biodistribution*) der B10-Antikörper (Tab. 22, Anhang Tab. A2 und A3) wurde deutlich, dass die Radioisotope in allen Tieren sehr schnell abgebaut und ausgeschieden wurden. Aufgrund des schnellen Abbaus waren die SPECT-Aufnahmen 24 und 48 Stunden nach Injektion negativ.

Tabelle 22: Verteilung der radioaktiv markierten Antikörper vier Stunden nach Injektion.

Organe	Spezifische biologische Verteilung (%ID/g)					
	B10			B10B10		
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Muskel	1,59	0,75	0,92	0,33	1,42	0,79
Leber	10,46	3,22	3,78	3,45	19,92	7,42
Pankreas	6,46	3,15	2,95	1,07	4,57	2,96
Milz	9,97	2,24	2,92	2,36	10,45	4,33
Niere links	5,98	21,07	4,72	1,02	3,96	2,19
Niere rechts	7,06	21,92	8,31	1,04	4,19	2,16
Magen	6,83	6,62	12,21	2,64	14,15	8,10
Oberer Darm	3,47	3,11	3,69	0,96	2,42	2,12
Unterer Darm	2,86	1,84	1,68	0,66	2,17	1,40
Herz	2,85	1,89	2,04	0,54	2,47	1,09
Lunge	6,56	3,36	3,11	0,71	3,44	1,96
Blut	2,86	3,51	3,36	0,86	4,16	2,19

Zusätzlich wurde die Ganzkörperretention von B10 und B10B10 untersucht (Tab. 23). Dafür wurde die Gesamtradioaktivität im Tier bestimmt und der prozentuale Anteil von der anfangs injizierten Aktivität angegeben. Dabei konnten ebenfalls die beiden radioaktiv markierten B10-Antikörper nach 24 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Messung der Ganzkörperretention des Antikörpers zum Zeitpunkt der Sektion.

Zeitpunkt nach Injektion	Maus	Radioaktivität in MBq					
		B10			B10B10		
		injiziert	Retention	% retiniert	injiziert	Retention	% retiniert
4 h	1	3,5	2,5	71	3,0	0,7	23
	2	3,4	1,5	44	3,2	2,1	66
	3	3,4	1,7	50	2,8	1,5	54
24 h	1	3,7	0,3	7	2,9	0,4	14
	2	3,4	0,2	7	3,1	1,1	36
	3	3,8	0,3	7	2,7	0,3	11
48 h	1	3,3	0,04	1	2,7	0,19	7
	2	3,3	0,08	2	2,9	0,15	5
	3	3,5	0,11	3	2,9	0,22	8

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mit Iod-125 markierten B10-Antikörpern bereits nach 24 Stunden fast nicht mehr in den Mäusen nachweisbar sind. Das steht im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten mit Zirkonium-89 markiertem Antikörper.

Im Weiteren wurden die nach der SPECT/CT-Messung entnommenen Organe mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. In allen Tieren wurden großflächige Amyloidablagerungen in Leber und Milz mittels Kongorotfärbung nachgewiesen (Abb. 44). Anschließend wurden die Proben vier Tage einer Autoradiographie-Emulsion ausgesetzt. Der radioaktiv markierte B10-Antikörper wurde durch die Autoradiographie spezifisch in Amyloid-positiven Bereichen in Milz (Marginalzone der weißen Pulpa, sowie roten Pulpa), Nieren und Leber (Portalzone) detektiert. Es konnte außerdem eine Kolokalisation von Kongorot-gefärbten Fibrillen und einer, durch den radioaktiv markierten Antikörper verursachte, Schwarzfärbung beobachtet werden.

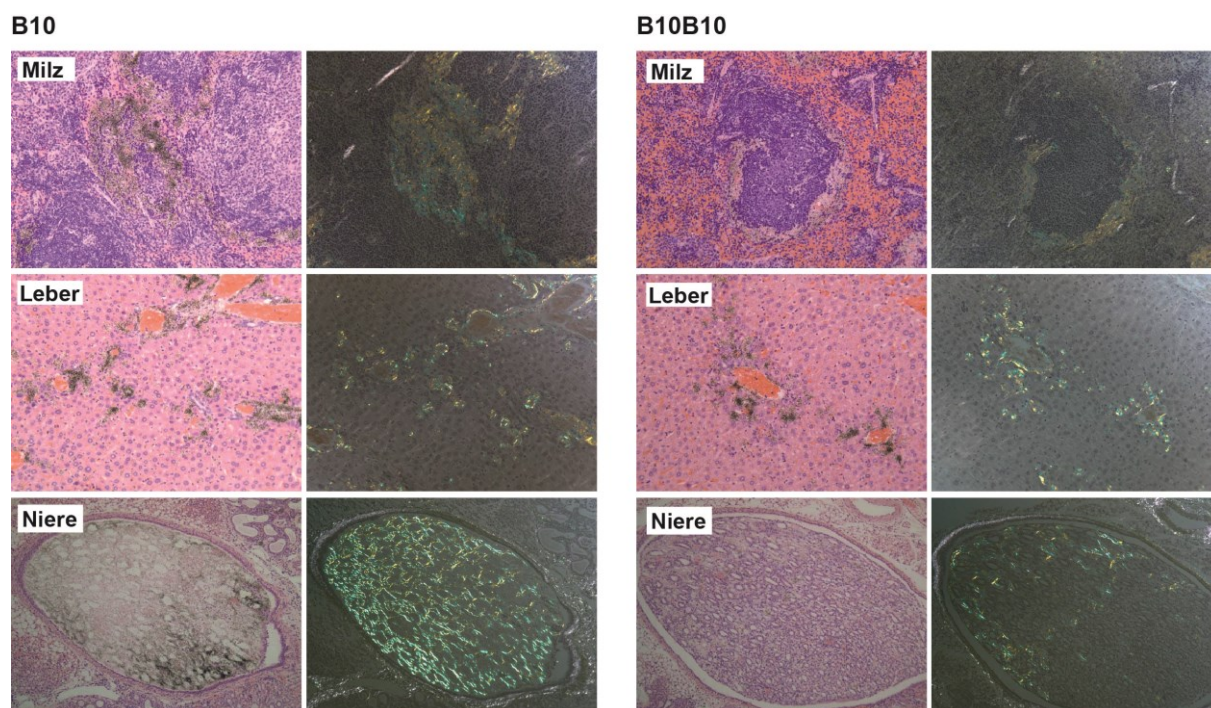


Abbildung 44: Kolokalisation von Kongorot-gefärbten Amyloidfibrillen und mittels Autoradiographie detektierten ^{125}I -markierten VHH-Antikörpern (20-fache Vergrößerung).

In Amyloid-negativen Organen (z.B. Lunge und Muskeln) konnten hingegen keine Antikörper nachgewiesen werden. Lediglich in der Leber konnten einzelne Amyloid-unabhängige Silberfärbungen detektiert werden. Möglicherweise durch restliches Blut im Lebergewebe, welches vier Stunden nach Injektion viel ungebundenen ^{125}I -B10 enthält. Zum Zeitpunkt 24 Stunden konnten nur noch spärliche Silberfärbungen in einzelnen Organen detektiert werden (Anhang Abb. A2) und 48 Stunden nach

Injektion war ^{125}I -B10 nicht mehr nachweisbar. Das bestätigte die Beobachtungen in SPECT/CT und bei der Radioaktivitätsbestimmung der einzelnen Organe hinsichtlich des raschen Antikörperabbaus.

Für ^{125}I -B10B10 (Abb. 45) waren die Silberfärbungen in zwei von drei Mäusen dunkler im Vergleich zu denen für ^{125}I -B10 (Abb. 44 und Anhang A2), was auf mehr gebundene Antikörper hindeutete und vergleichbar mit den SPECT/CT- und Biodistributionsdaten war. Wie für B10 war auch für B10B10 nach 24 und 48 Stunden kaum Silberfärbung von Amyloid-positiven Bereichen nachweisbar. Jedoch spricht der geringe Nachweis von ^{125}I -B10B10 48 Stunden nach Injektion für einen im Vergleich zu ^{125}I -B10 längeren Verbleib im Gewebe bzw. eine langsamere Dehalogenierung.

Die histologische Auswertung entspricht weitestgehend den Beobachtungen im SPECT/CT und bestätigt die o.g. Annahme, dass Iod-125 markierte B10-Antikörper nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar sind.

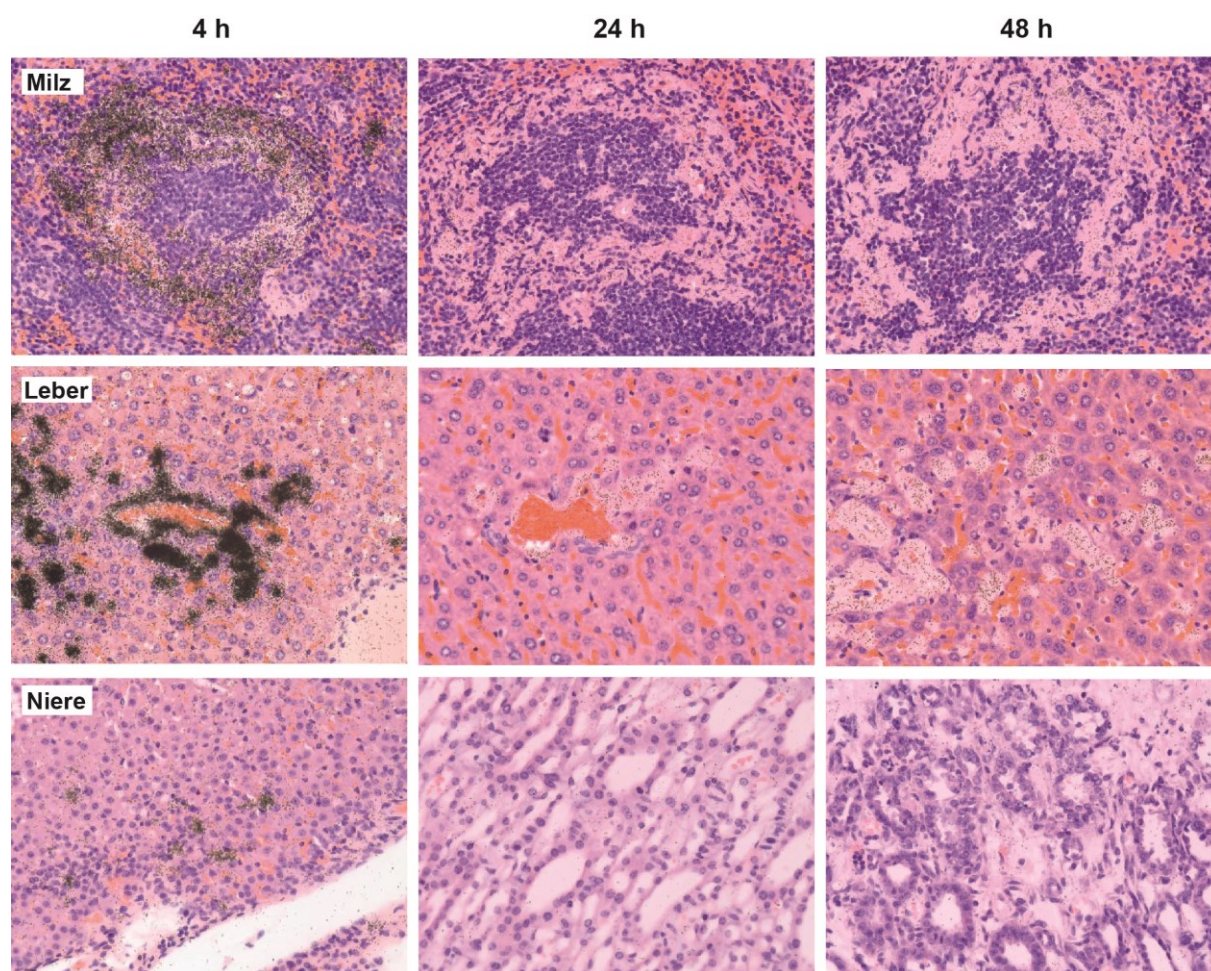


Abbildung 45: Autoradiographie von Milz-, Leber- und Nierengewebeschnitten der mit ^{125}I -markiertem B10B10 injizierten transgenen huIL-6-Mäuse. In 40facher Vergrößerung ist zu erkennen, dass nach 48 Stunden vereinzelte Silberfärbungen zu erkennen sind.

Des Weiteren wurde, anhand der im Blut der Mäuse gemessenen Radioaktivität (Tab. 22, Anhang Tab. A2 und A3) 4 h, 24 h und 48 h p.i., die Serumhalbwertszeit von B10 und B10B10 in transgenen huIL-6 Mäusen bestimmt (Abb. 46). Die Berechnung auf Grundlage einer Kinetik 1. Ordnung erfolgte wie in den vorangegangenen Experimenten beschrieben. Es ist zu erkennen, dass erneut eine bis zu 10-fache Reduktion der Radioaktivität im Blut der Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden zu verzeichnen war. In den histologischen Untersuchungen (Abb. 45) war ebenfalls eine deutliche Verminderung der Radioaktivität innerhalb von 24 Stunden zu beobachten. Das lässt vermuten, dass der B10B10- bzw. der B10-Antikörper nicht durch Bindung an den Amyloidfibrillen aus dem Blut eliminiert, sondern sehr wahrscheinlich abgebaut und ausgeschieden wurden.

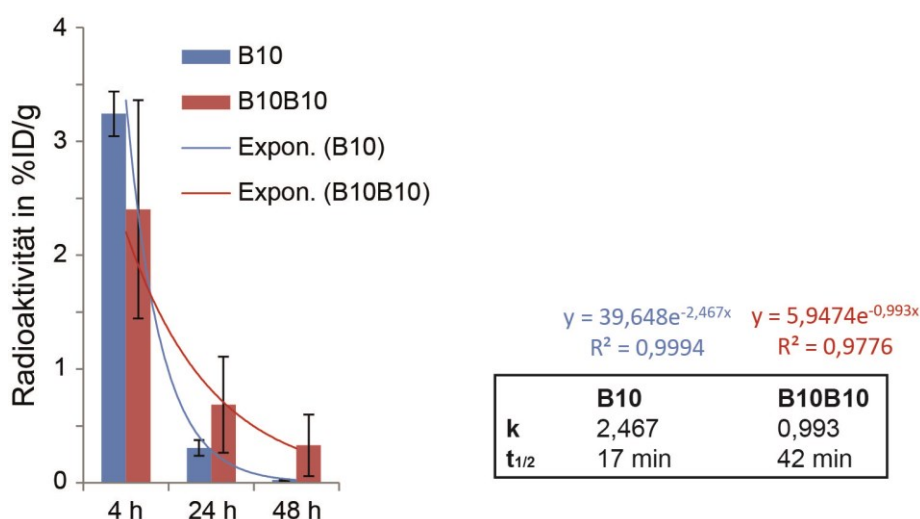


Abbildung 46: Berechnung der Serumhalbwertszeit für B10 und B10B10 in transgenen huIL-6 Mäusen. Mittels Bohrlochmessung wurde die Radioaktivität im Blut bestimmt und anschließend normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils drei Tieren pro Zeitpunkt und Antikörper. Die Halbwertszeitkonstante k wurde der exponentiellen Gleichung der Trendlinie entnommen und zur Berechnung der Halbwertszeit über $t_{1/2} = \ln 2/k$ verwendet.

Für B10B10 wurde mit den gemittelten Werten eine Serumhalbwertszeit von 42 Minuten berechnet (Abb. 46). Trotz der starken Varianz innerhalb der 4 h-Werte, liegt die ermittelte Halbwertszeit für B10B10 in Amyloid-belasteten Tieren in einem vergleichbaren Bereich zu den zuvor bestimmten Werten (54 min, 42 min). Für den monovalenten B10 VHH-Antikörper wurde eine Halbwertszeit von 18 min ermittelt.

3.7.5 Zusammenfassung der bildgebenden Versuche

Der VHH-Antikörper B10B10 wurde zur Detektion von Amyloidfibrillen in zwei verschiedenen Mausmodellen getestet. Zum einen das AA-Amyloidose-Induktionsmodell und zum anderen das transgene huIL-6-Mausmodell. In beiden Modellen wird die verstärkte Bildung von SAA stimuliert.

Als Folge dessen werden AA-Fibrillen gebildet und vornehmlich in Milz und Leber abgelagert. Auf der anderen Seite weisen die Modelle in einigen Punkten methodische Unterschiede auf, was Differenzen in den erhobenen Daten verursachen kann (Tab. 24).

Tabelle 24: Zusammenfassung der Unterschiede bei der Bildgebung von Amyloidosen in zwei verschiedenen Mausmodellen

	Induktionsmodell	H2/huIL-6 Mausmodell
Antigen	Murines AA	Humanes AA
Mausstamm	NMRI Auszuchtstamm	Balb/c Inzuchtstamm
Messmethode	PET/CT	SPECT
Tierzustand bei Messung	lebend	<i>Post mortem</i> und entblutet
Isotop	^{89}Zr	^{125}I
Markierung	Über Desferrioxamin an Lysinseitenketten	Mithilfe von Chloramin T direkt an Tyrosinseitenketten
Reinigung	Zentrifugalfiltration	Größenausschlussfiltration
Markierungsgrad	0,5	0,55
Spezifische biologische Verteilung	Keine Verringerung der Radioaktivität in den Organen über den Beobachtungszeitraum	deutliche Verringerung der Radioaktivität in den Organen über den Beobachtungszeitraum
Histologie	Kryo	Paraffin
Serumhalbwertszeit für B10B10	54 min und 42 min	42 min
Probleme	- Starke Messsignale in PBS-Tieren - Starke Varianz von Maus zu Maus	- Verzicht auf <i>wt</i> Kontrolle - Starke Varianz von Maus zu Maus

Trotz der genannten Unterschiede war es möglich in allen drei Experimenten eine Aufnahme des B10B10 in amyloidhaltiges Leber-, Milz- und zum Teil auch Nierengewebe zu beobachten. Diese Aufnahme innerhalb von zwei bis vier Stunden konnte durch bildgebende Verfahren (PET/CT, SPECT/CT), sowie durch anschließende Radioaktivitätsmessung in den einzelnen Organen und histologische Untersuchungen bestätigt werden. Ein bis zwei Tage nach der Injektion wurden mittels SPECT/CT, in dem ^{125}I -B10B10 verwendet wurde, und PET/CT, wo B10B10-DFO- ^{89}Zr verwendet wurde, deutliche Unterschiede beobachtet. Während beim Einsatz von ^{125}I -B10B10 nach 24 Stunden

kein Signal in SPECT/CT und in der Autoradiographie zu erkennen war, stiegen die radioaktiven Signale beim Einsatz von B10B10-DFO-⁸⁹Zr bis 48 Stunden p.i. an. Außerdem konnte in den Versuchen mit B10B10-DFO-⁸⁹Zr ein Anstieg der Radioaktivität in Amyloid-negativen PBS-Kontrolltieren beobachtet werden. In der Analyse der biologischen Verteilung (*biodistribution*) und PET/CT-Messungen war dies deutlich zu erkennen. In den histologischen Untersuchungen mittels Autoradiographie konnte jedoch nur eine, im Vergleich zum Amyloid-positiven Gewebe, schwache und diffuse Silberfärbung beobachtet werden.

Bei der Berechnung der Serumhalbwertszeit von B10B10 konnte ein methodenübergreifender Wert von durchschnittlich 46 Minuten in Amyloidose-assoziierten Tieren bestimmt werden. Dieser Wert ist vergleichbar mit Literaturangaben ähnlicher bivalenter Antikörperfragmente (36 min (Hutt et al. 2012), 54 min (Coppieters et al. 2006)).

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte, ausgehend von den VHH-Antikörpern B10 und B10AP, ein Detektionssystem zur *in situ* Bildgebung von einer AA-Amyloidose entwickelt werden. Dazu wurden, nachdem für B10AP eine hohe Immunogenität beobachtet wurde, Antikörper auf Basis der VHH-Domäne B10 entwickelt, die strukturelle und funktionelle Varianten zu dem bivalenten B10AP und zum monovalenten B10 darstellen. Diese B10-Varianten wurden *in vitro* auf die Bindung von Amyloidfibrillen charakterisiert und anschließend in NMRI-Mäusen auf ihre immunologische Wirkung und Ausbildung von Antikörpern gegen die B10-Formate getestet. Daraufhin wurde B10B10, aufgrund seiner geringen Immunogenität, erfolgreich in zwei verschiedenen AA-Amyloidose Mausmodellen zur Entwicklung eines Detektionssystems der AA-Amyloidose mit PET/CT eingesetzt.

4.1 Entwicklung neuartiger B10-Antikörperformate zur Detektion von Amyloidosen

Die VHH-Domäne B10, sowie das bivalente B10AP, sind sehr gut charakterisierte Binder für Amyloidfibrillen (Habicht et al. 2007, Haupt et al. 2011a und b). B10AP hat im Vergleich zum monovalenten B10 zwei entscheidende Vorteile hinsichtlich des Einsatzes im Mausmodell. Zum einen bindet es mit einer aK_D von ca. 7 nM deutlich besser an Amyloidfibrillen als B10 mit einer aK_D von ca. 475 nM. Zum anderen wird B10AP, als funktionales Dimer mit ca. 128 kDa, langsamer über die Niere (Filtergröße ca. 70 kDa) ausgeschieden, als B10 mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa. Es gibt zahlreiche Studien, die diesen Zusammenhang vermuten lassen, da auch in diesen Fällen durch eine Vergrößerung des Antikörpers eine deutlich längere Serumhalbwertszeit beobachtet werden konnte (Coppeters et al. 2006, Schlapschy et al. 2013). Jedoch kann die Größe eines biopharmazeutischen Proteins ebenso Nachteile haben. Je größer ein Protein, umso schlechter kann es in das Gewebe diffundieren und umso besser ist es durch Immunzellen in der Maus erkennbar.

Für den Einsatz in der Bildgebung der AA-Amyloidose sollten, ausgehend von B10 und B10AP, neuartige B10-Antikörper hergestellt werden. Diese sollten die Lücke zwischen den Eigenschaften von B10AP und B10 schließen und die Vorteile der beiden Antikörper verbinden. Das besondere Augenmerk lag dabei auf der Größe der Antikörper und damit verbunden der Bindungsaffinität zu Amyloidfibrillen, der Immunogenität und Serumhalbwertszeit.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit das monovalente und bispezifische B10AB, die bivalenten Antikörper B10B10, B10Dhlx, das bivalente und bispezifische B10B10AB und das tetravalente B10B10Dhlx rekombinant hergestellt. Der 21 kDa-große Antikörper B10AB sollte vergleichbar zur

ursprünglichen B10-Domäne (ca. 16 kDa) sein, jedoch hinsichtlich der Serumhalbwertszeit, durch das C-terminale albuminbindende Peptid AB, verbessert werden (Dennis et al. 2002). Das Format B10B10AB stellt die entsprechende bivalente Variante dar. Die Bindung dieser Formate an murines Serumalbumin konnte erfolgreich gezeigt werden (Abb. 22). Aufgrund der C-terminalen Doppelhelix (Dhlx) können B10Dhlx und B10B10Dhlx dimerisieren und ein ca. 43 kDa bzw. ca. 76 kDa großes B10-Konstrukt ausbilden.

Durch rekombinante periplasmatische Expression mittels Hochzelldichtefermentation und der anschließenden Reinigung mittels Metallaffinitäts- und Ionenaustauschchromatographie konnten nur 8 bzw. 6 mg B10B10AB und B10B10Dhlx aus mehr als 100 g FBM hergestellt werden. Im Vergleich dazu konnten beispielsweise 63 mg B10B10 aus 120 g FBM gewonnen werden (s. Tab. 18). Außerdem war die Expression von B10B10AB und B10B10Dhlx im Vergleich zu B10B10 nur mithilfe eines abgeschwächten *lac*-Operon, des Chaperons Skp und durch eine Temperaturabsenkung auf 22°C möglich (s. Abb. 17).

VHH-Antikörper werden hauptsächlich im Periplasma exprimiert (Muyldermans 2001), das, im Gegensatz zum Zytoplasma, durch seine oxidierende Umgebung die Ausbildung von Disulfidbindungen bei der Proteinfaltung unterstützt. Der periplasmatische Transport der B10-Proteine wurde in dieser Arbeit durch die Signalsequenz pelB koordiniert. Willuda et al. (2001) haben bei der periplasmatischen Expression eines dimeren Miniantibodies, bestehend aus einer Dhlx, eine um 75 % reduzierte Ausbeute im Vergleich zum entsprechenden Monomer ohne Dhlx verzeichnen müssen. Eine Vergrößerung des Produkts durch die Dhlx ergab, wie im Fall von B10B10Dhlx, eine Verringerung der Ausbeute.

Die Aggregation von Proteinen ist u.a. Linker-abhängig (Whitlow et al. 1993, Muyldermans 2001). Vor allem scFv-Antikörper werden häufig, aufgrund ihrer Linkerregion zwischen zwei Domänen, mit Proteinaggregation in Verbindung gebracht (Muyldermans 2001). Da B10B10AB einen sehr hohen Anteil an Linkerregionen (57 AS: 16,3 % des Gesamtproteins, Abb. 15) besitzt, kann man davon ausgehen, dass die geringe Ausbeute bei der Expression durch Proteinaggregation im Periplasma verursacht wird. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte erst durch die Temperaturabsenkung und den Einsatz eines Chaperons der Anteil unlöslichen und aggregierten Proteins verringert werden (Rosano und Ceccarelli 2014).

Durch die gentechnische Kopplung der Doppelhelix an eine oder zwei verbundene B10-Domänen kann eine Bi- bzw. Tetravalenz generiert werden, die eine verbesserte Bindungsaffinität zu den Amyloidfibrillen zur Folge haben sollte. In den Bindungsstudien mittels SPR konnte jedoch durch die Tetravalenz keine, im Vergleich zum B10, vierfach-verstärkte Bindungsaffinität beobachtet werden.

Die Dissoziationskonstante von B10B10Dhlx (ca. 160 nM) war eher zwischen mono- und bivalenten B10-Fomaten einzuordnen. Für das monovalente Konstrukt B10AB ($aK_D \approx 480$ nM) konnte innerhalb des Experiments eine mit B10 (ca. 640 nM) vergleichbare Dissoziationskonstante ermittelt werden. Beide Werte lagen in einer, der Literatur entsprechenden ($aK_D \approx 475$ nM), Größenordnung (Habicht et al. 2007). Die bivalenten B10-Antikörper B10B10 ($aK_D \approx 42$ nM), B10B10AB ($aK_D \approx 23$ nM) und B10Dhlx ($aK_D \approx 46$ nM) waren ebenfalls innerhalb der SPR-Untersuchung analog zu B10AP ($aK_D \approx 18$ nM), dessen Dissoziationskonstante mit der Literatur vergleichbar war ($aK_D \approx 7$ nM; Habicht et al. 2007).

Für B10B10Dhlx konnte, entgegen der Erwartungen, keine Dissoziationskonstante ermittelt werden, die jene von B10AP übersteigt. Alle Kurvenanpassungen nach dem 1:1-Affinitätsmodell erreichen spätestens bei der höchsten gemessenen Antikörperkonzentration die Plateauphase. Diese Phase stellt eine Sättigung der freien Bindungsstellen auf den Amyloidfibrillen durch B10-Antikörper dar. Die Kurvenanpassung zur Bindung von B10B10Dhlx an Amyloidfibrillen erreicht diese Phase nicht. Dadurch konnte das 1:1-Affinitätsmodell nur mit starken Abweichungen der Messpunkte angewandt werden. Eine andere Modellberechnung wurde nicht durchgeführt, da die K_D -Werte der Antikörper untereinander vergleichbar sein sollten und dieses Modell bereits für B10AP und B10 (Habicht et al. 2007) angewandt wurde. Es wurde daher von apparenten K_D -Werten ausgegangen. Der angegebene K_D -Wert spiegelt somit nicht die tatsächlichen Bindungsverhältnisse wider, kann jedoch zum Vergleich mit den anderen B10-Antikörpern herangezogen werden. Eine Ursache für die Abweichungen der Messpunkte vom 1:1-Affinitätsmodell könnten nicht-spezifische Bindungen an den Amyloidfibrillen sein. Diese ergeben laut *Biacore Assay Handbook* (29-0194-00 Edition AA, GE Healthcare Life Science) Messpunkte, die mit keinem Interaktionsmodell vereinbar sind. Dabei ist eine kontinuierliche Erhöhung der Resonanzeinheit (RU) mit zunehmender Konzentration des Antikörpers typisch. Es wird keine Plateauphase erreicht. Jedoch sprechen die starken Signale auf der Flusszelle ohne Amyloidfibrillen gegen unspezifische Wechselwirkungen mit den Amyloidfibrillen, sondern viel mehr für eine Bindung des B10-Antikörpers an das Streptavidin des SA Chips, der für die SPR-Messung eingesetzt wurde.

Bei einer Diskussion über die Affinität der verschiedenen B10-Antikörper ist stets zu beachten, dass eine sehr hohe Affinität auch beim Einsatz zur Detektion in der Maus von Nachteil sein kann. Beispielsweise hat das Peptid p5+R eine höhere Affinität zu Amyloidfibrillen als das Peptid p5. Das Peptid p5 penetriert jedoch aufgrund dessen besser, als p5+R, in das Gewebe, da es primäre Bindungsstellen verpasst und erst im Zentrum einer Amyloidablagerung bindet. Diese Beobachtung wurde als „*binding-site barrier effect*“ beschrieben (Wall et al. 2013).

Es gilt eine Balance zwischen einem möglichst kleinem, einfach herstellbaren Antikörper, der gut gewebegängig ist und weniger schnell durch das Immunsystem erkannt wird, und hinreichend großen Antikörpern, die eine längere Serumhalbwertszeit und eine möglichst hohe Affinität zu Amyloidfibrillen besitzen und nicht zu schnell ausgeschieden werden, zu finden. Die hergestellten B10-Varianten bieten bereits eine große Auswahl an diesbezüglichen Eigenschaften.

4.2 Einige B10-Formate verursachen eine starke Immunogenität

Wenn ein biopharmazeutisches Protein zur Diagnostik oder Therapie im Organismus eingesetzt werden soll, müssen zuvor seine Immunogenität und die Bildung von *anti-drug antibodies* (ADA) bestimmt werden (Leitlinien der FDA und EMA). Für die Untersuchung zur Immunogenität der B10-Antikörper wurden NMRI-Mäuse verwendet. Der NMRI-Stamm ist ein Auszuchtstamm. Das bedeutet, es liegt eine genetische Variabilität vor, die eine natürliche Population an Individuen repräsentiert. Somit ist der NMRI-Stamm ideal für pharmakologische Untersuchungen. Abweichungen einzelner Tiere innerhalb des Experiments sind möglicherweise auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen.

Die Immunogenität der B10-Formate wurde durch deren Injektionen an drei aufeinander folgenden Tagen in die Mäuse untersucht. Da die B10-Antikörper zukünftig auch mehrfach in ein Individuum appliziert werden sollen, um den Krankheitsverlauf einer AA-Amyloidose mittels PET/CT beobachten zu können, wurden die Injektionen zwei Wochen später auf die gleiche Weise in dieselben Tiere wiederholt. Dadurch wurde eine sekundäre Immunantwort erzeugt, bei der hauptsächlich IgG-Antikörper in der Maus gebildet werden. Die Bildung dieser IgG-Antikörper gegen die injizierten B10-Formate wurde anschließend in Blutserumproben (ein Tag vor Injektion und anschließend wöchentlich entnommen) mittels ELISA untersucht (Abb. 25). Dabei diente das Peptid p5 als Negativkontrolle, welches ein gleichbleibendes Absorptionssignal im ELISA aufwies. Das bestätigt die in der Literatur prognostizierte Immuntoleranz des Peptids (Wall et al. 2011b).

Für die VHH-Domäne B10 wurde in drei der vier Mäuse eine gleichbleibend niedrige Konzentration an anti-B10-IgG-Antikörpern nachgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass entweder die VHH-Domäne B10 nicht immunogen ist, oder, aufgrund der sehr kurzen Serumhalbwertszeit von ca. 18 Minuten, so schnell ausgeschieden wird, dass es zu keiner Immunantwort in der Maus kommt. B10B10 verursachte in zwei Mäusen einen kontinuierlichen und in einer Maus einen, nach der zweiten Injektion, sprunghaften Anstieg der Absorptionssignale. Eine weitere Maus zeigte keinerlei Veränderungen über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier Wochen. B10B10 weist demnach eine sehr geringe Immunogenität auf. Im Fall der B10-Formate B10AB, B10B10AB und vor allem B10Dhlx war ein starker Anstieg der Absorptionssignale im ELISA nach der zweiten Injektion zu

erkennen. Das heißt, nach der zweiten Injektion von B10-Formaten wurden in den Mäusen deutlich mehr IgG-Antikörper gegen den VHH-Antikörper gebildet, ausgelöst durch eine sekundäre Immunantwort. B10B10Dhlx und B10AP wiesen bereits nach der ersten Injektion die mit Abstand schnellste und stärkste Bildung von IgG-Antikörpern auf.

Ob und wie stark eine Immunantwort im Organismus durch ein biopharmazeutisches Produkt ausgelöst wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Krishna und Nadler 2016). Diese können in Applikations-, Empfänger (Patienten)- und Proteinspezifische Faktoren unterteilt werden (Pineda et al. 2016). Bei den proteinspezifischen Faktoren ist beispielsweise die Größe des Antigens entscheidend. Da kleine Proteine (< 70 kDa) schnell über die Nieren ausgeschieden werden (Strohl 2015), besitzt sie z.B. eine kürzere Serumhalbwertszeit als größere Proteine. Das erhöht die Möglichkeit der Erkennung des Fremdproteins durch das Immunsystem des Empfängers (Abb. 47). Die Verwendung von *nanobodies*, wie B10, stellt somit einen großen Vorteil bei der Verringerung der Immunogenität eines Biopharmazeutikums dar (Muyldermans 2001, siehe 1.6.1.). Da B10AP (Dimer ~128 kDa) und B10B10Dhlx (Dimer ~78 kDa) im Gegensatz zu *nanobodies* sehr große Proteine sind, ist eine längere Serumhalbwertszeit und damit verbunden eine bessere Erkennung als körperfremdes Antigen durch das Immunsystem zu erwarten (Abb. 47). Die VHH-Domäne B10 (ca. 16 kDa) und das Peptid p5 (ca. 3 kDa) wiesen, als die kleinsten getesteten Moleküle, dieser Annahme folgend keine Immunogenität auf.

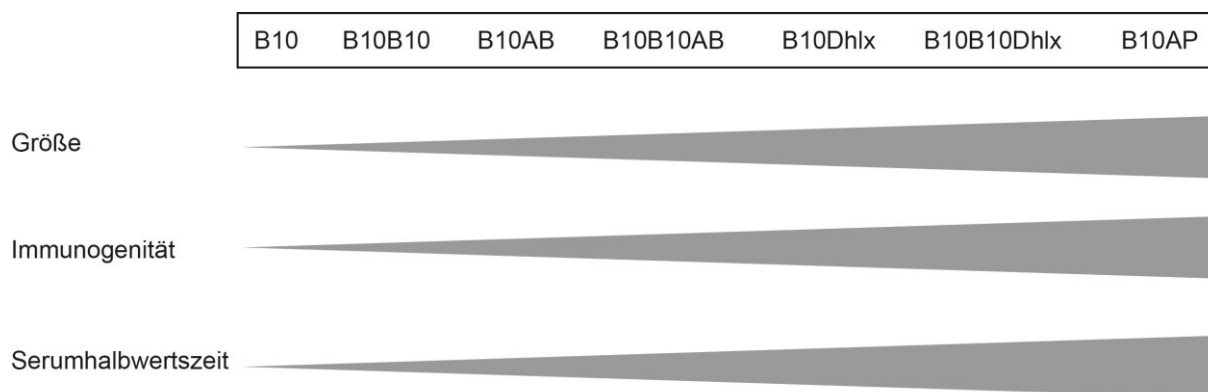


Abbildung 47: Vergleich der Eigenschaften aller B10-Formate. Dabei fällt ein Zusammenhang zwischen Größe, Immunogenität und Serumhalbwertszeit auf. Je nach Anwendung könnte ein größeres B10-Konstrukt eingesetzt werden, das eine längere Serumhalbwertszeit hat, aber auch eine stärkere Bildung von IgG-Antikörpern (*anti drug antibodies*, ADA) verursacht.

Weiterhin ist der strukturelle Aufbau des Antigens bei der Auslösung einer Immunantwort entscheidend. Therapeutische monoklonale Antikörper besitzen durch ihren Fc-Teil eine zytotoxische Aktivität (ADCC, CDC). Dabei ist die Verwendung von *nanobodies*, wie die B10-Formate, die keinen Fc-Teil besitzen, von Vorteil (Muyldermans 2001, Muyldermans 2013). Zusätzlich sind *nanobodies*

nicht posttranslational modifiziert (z.B. Glykosylierungen), was die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren in der Maus und im Patienten in diesem Bereich umgeht. Das genetisch an B10 gekoppelte Albumin-bindende Peptid AB (Dennis et al. 2002, Nguyen et al. 2006) und die Doppelhelix Dhlx (Willuda et al. 2001, Kubetzko et al. 2006) wurden bereits in Tierversuchen angewendet. Jedoch wurde die Immunogenität bisher nicht untersucht.

Die Bildung von Antikörpern gegen therapeutische Proteine (ADA, *anti-drug antibodies*) ist ein häufig beobachtetes Phänomen (Schellekens 2002, Baker et al. 2010, Shankar et al. 2014) und kann mit einem Funktionsverlust einhergehen. Die in dem Fall vorliegenden neutralisierenden Antikörper binden im aktiven Zentrum der therapeutischen Antikörper. Jedoch können ADA bei einer Bindung außerhalb des Epitops einen nicht-neutralisierenden Effekt haben, der trotzdem zu einer eingeschränkten therapeutischen Wirkung führen kann. Dazu wurden bereits viele Studien mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt (Baker et al. 2010, Pineda et al. 2016). Beispielsweise konnten für den zugelassenen therapeutischen monoklonalen Antikörper Adalimumab ein hohes Niveau an ADA (Häufigkeit im Patienten bis zu 26 %) nachgewiesen werden (Baker et al. 2010). Die Funktion von Adalimumab, die Blockierung von TNF- α und die damit verbundene Behandlung von z.B. rheumatoider Arthritis, wurde dabei nicht eingeschränkt (Baker et al. 2010, Pineda et al. 2016). Bei der Entwicklung neuer biopharmazeutischer Proteine ist daher eine detaillierte Untersuchung der Immunogenität von großem Interesse. Die detektierten ADA müssen dazu hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an biopharmazeutischen Proteinen genau verifiziert werden (Mire-Sluis et al. 2004, Wadhwa et al. 2015). Dabei ist die gewählte Analysemethode (u.a. ELISA, RIA) von großer Bedeutung. Bei der Untersuchung der Immunogenität von Adalimumab wurde durch verschiedene Methoden im Zeitraum von 2003 bis 2015 eine ADA-Rate von 1 bis 66 % im Patienten bestimmt. Wurde lediglich ein ELISA durchgeführt, lag die detektierte ADA-Häufigkeit bei unter 10 % (Pineda et al. 2016). Durch die Immobilisierung des biopharmazeutischen Proteins auf der Plastikoberfläche und damit verbundenen Konformationsänderungen, kann in einem direkten ELISA die Menge an ADA unterschätzt werden (Pineda et al. 2016). Ein „Capture“-ELISA (Wadhwa et al. 2015), bei dem ADA das immobilisierte Protein binden und diese Bindung durch eine konjugierte Variante des Proteins detektiert wird, wird als selektiver und spezifischer eingeschätzt.

In dieser Arbeit wurde ein erster *in vitro* Test mit den gegen B10AP gebildeten ADA durchgeführt. Nach Inkubation von ADA-haltigem Serum und B10AP wurde ein Dotblot mit immobilisierten Amyloidfibrillen durchgeführt. Dem Vergleich mit nicht-inkubiertem B10AP konnte kein auffälliger Unterschied festgestellt werden (Abb.14). Das bedeutet, dass die in den Mäusen gebildeten ADA gegen B10AP keine neutralisierende Wirkung auf die Bindung von B10AP haben. Möglicherweise

wurden die detektierten ADA im Fall des B10AP v.a. gegen die alkalische Phosphatase (AP) bakteriellen Ursprungs (*E.coli*) gerichtet. Die AP von *E.coli* ist nur knapp 30 % homolog zu der murinen AP (Sharma et al. 2014). Laut der EMA Leitlinie (*Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins*, 2015) kann durch diese Unterschiede in der Aminosäuresequenz eine Immunantwort ausgelöst werden. Es würden Antikörper gegen die bakteriellen AP gebildet werden. Außerdem ist es denkbar, dass bei der klonalen Expansion der B-Zellen auch B10-bindende Antikörper gebildet werden. Die alkalische Phosphatase würde als Adjuvants bei der Bildung von Antikörpern gegen B10 wirken. Das lässt sich dadurch verstärken, dass beim Immunogenitätstest ein anti-B10-IgG-Titer von nur 1:500, aber ein anti-B10AP-IgG-Titer von 1:10000 gemessen werden konnte.

Man geht davon aus, dass fast alle rekombinant hergestellten biopharmazeutischen Proteine im Patienten eine Bildung von ADA verursachen (Krishna und Nadler 2016). Jedoch ist dies nicht grundlegend mit einem Funktionsverlust des biopharmazeutischen Proteins verbunden. Erste Tests mit anti-B10AP IgG-Antikörpern belegten diese Annahme. Hohe Absorptionssignale im ELISA zur Untersuchung der Immunogenität der B10-Formate müssen nicht zum finalen Ausschluss von einzelnen B10-Antikörpern führen. Zuvor muss die neutralisierende Wirkung dieser ADA in weiteren Experimenten geprüft werden. In dieser Arbeit wurde dennoch auf den Einsatz von B10AP in der Entwicklung einer Bildgebung verzichtet, um eventuell negative Einflüsse der anti-B10AP Antikörper (z.B. eventuell schnellerer Abbau des B10AP durch Opsonierung) zu umgehen.

Tabelle 25: Zusammenfassung der in dieser Arbeit ermittelten Parameter für B10B10.

	B10B10	Verweis
Rekombinaten Herstellung	63 mg ZP/ 120 g FBM	Tab. 18, Abb. 18 und 19
Dissoziationskonstante aK_D	42 ± 3 nM	Abb. 23
Anti-B10B10 IgG-Titer (Immunogenität)	1:500	Tab. 19, Abb. 25
Serumhalbwertszeit	durchschnittlich 46 min	Abb. 35, 39, 44
Größe	32,8 kDa	Tab. 17

Nach Abschätzung seiner Vor- und Nachteile (Tab. 25), auch hinsichtlich der sehr geringen ADA-Bildung, wurde B10B10 als der geeignete Kandidat für den Einsatz in der Maus zur Bildgebung einer AA-Amyloidose, ausgewählt.

4.3 Entwicklung eines funktionalen Detektionssystems zur Darstellung der AA-Amyloidose im Mausmodell

Mithilfe des bivalenten VHH-Antikörpers B10B10 wurde ein Detektionssystem zur Darstellung einer systemischen AA-Amyloidose in der Maus entwickelt. Dazu wurde der B10B10 mit Desferrioxamin gekoppelt und durch radioaktives Zirkonium-89 markiert. Der markierte Antikörper wurde in NMRI-Mäuse injiziert, in denen zuvor eine AA-Amyloidose induziert wurde. Nach der Injektion (p.i.) des Antikörpers wurde seine Verteilung in der Maus mittels PET/CT und Untersuchung der Radioaktivität in den Organen beobachtet und anschließend histologisch mittels Autoradiographie bestätigt. Dabei sind die Leber, Nieren und Milz, die maßgeblich bei einer AA-Amyloidose betroffen sind, von besonderem Interesse gewesen.

Bei der Auswertung der PET/CT-Daten konnte zum Zeitpunkt zwei Stunden p.i. ein erkennbarer Unterschied zwischen den Mäusen mit und ohne einer induzierten Amyloidose beobachtet werden (Abb. 39). Die Milz und Leber der Amyloidose-Tiere zeigten durchschnittlich stärkere PET-Messsignale, als die der PBS-Tiere. Die Daten zur spezifischen biologischen Verteilung bestätigten diese Beobachtung (Abb. 38). Das lässt eine spezifische Bindung des Antikörpers an Amyloidfibrillen in Milz und Leber vermuten. Bestätigt wurde dies durch die anschließenden histologischen Untersuchungen. Dabei fiel auf, dass nur in erkrankten Mäusen ein vermehrtes Auftreten des Antikörpers in kongorot-positiven, d.h. amyloidhaltigen, Bereichen der Milz und Leber zu erkennen war (Abb. 40). Zusätzlich wurden bei der PET/CT-Messung deutliche Signale in der Blase der PBS-Tiere, im Gegensatz zu den erkrankten Tieren, beobachtet. Man kann davon ausgehen, dass der ungebundene B10B10-Antikörper schnell als körperfremdes Protein erkannt und den Immunzellen in der Milz präsentiert wurde, was die PET-Signale in der Milz erklären würde. Messsignale in Leber und Blase deuteten auf eine schnelle Ausscheidung des erkannten und abgebauten B10B10-Antikörpers hin. Die schnelle Ausscheidung des ungebundenen Peptids p5, ein Amyloidbinder, wurde bereits beschrieben (Martin et al. 2014). Deshalb wurde 24 Stunden nach der Injektion des B10-Antikörpers in die PBS-Tiere ebenfalls eine Abschwächung der radioaktiven Messsignale durch weitere Ausscheidung vermutet. In den erkrankten Tieren wäre eine weitere Anreicherung des Antikörpers in Leber und Milz, oder eine beginnende Ausscheidung zu erwarten gewesen. Tatsächlich haben wir eine Angleichung der Messwerte in PBS- und Amyloidose-Tieren beobachtet. Das heißt, die Signale in der Leber und Milz der PBS-Tiere haben sich erhöht und in den Amyloid-Mäusen wurden niedrigere Werte, als zum vorherigen Zeitpunkt gemessen (Abb. 38 und 39). Anzeichen einer Antikörperausscheidung durch PET-Signale in der Blase konnten nicht mehr beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde der mit Iod-125 markierte B10B10 in transgenen huIL-6 Mäusen bereits 24 Stunden nach Injektion mittels SPECT/CT und anschließender Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Organe (*biodistribution*) nicht mehr

detektiert (Anhang Tab. A2). Lediglich histologisch konnten geringe Mengen radioaktiven Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 45). Zum Zeitpunkt 48 Stunden p.i. nahm die Radioaktivität in Milz und Leber aller Tiere noch einmal zu. Durch Ausscheidung ungebundener Antikörper wäre eine deutliche Abnahme der Radioaktivität in PBS-Tieren zu erwarten gewesen. Beispielsweise zeigten die monoklonalen mit Iod-125 markierte Antikörper 2A4, 7D8 und 8G9 (Wall et al. 2011a) in *wt*-Mäusen kein Signal zum Zeitpunkt 48 Stunden. In Mäusen mit nachweisbaren Amyloidablagerungen konnten jedoch zur gleichen Zeit deutliche Signale in Milz und Leber beobachtet werden. Andererseits konnte in einer weiteren Studie mit einem bivalenten Fcp5-Protein, ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen *wt* und transgenen Mäusen bei der Untersuchung der *biodistribution* nachgewiesen werden (Foster et al. 2017).

Eine spezifische Bindung von B10B10-DFO- ^{89}Zr in Amyloidose-Mäusen konnte 24 Stunden nach der Injektion mittels PET/CT nicht mehr beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung liegt in der Komplexierung von Zirkonium-89 durch Desferrioxamin.

Zirkonium-89 ist ein weit verbreitetes Isotop für PET-Messungen, das zur Markierung von monoklonalen Antikörpern beispielsweise in der Krebsforschung seit langer Zeit eingesetzt wird (Deri et al. 2013). Aufgrund seiner Halbwertszeit von 3,3 Tagen ist Zirkonium gebunden an monoklonale Antikörper, die erst innerhalb von drei bis fünf Tagen im Tumor akkumulieren, sehr geeignet (Meijs et al. 1997). Der Goldstandard für die Komplexierung des $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ions ist das natürlich vorkommende bakterielle Siderophor Desferrioxamin (DFO) (Meijs et al. 1992), welches über verschiedene funktionelle Gruppen an einen Antikörper kovalent gebunden werden kann (Fischer et al. 2013). Für unsere Versuche mit dem VHH-Antikörper B10B10 haben wir das p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin-Derivat verwendet (Perk et al. 2010) und in einem 1000-fachen Überschuss zum Zirkonium eingesetzt. Nach der Reaktion wurde der Ansatz über Zentrifugenfilter gereinigt und somit nicht-komplexiertes Zirkonium entfernt. Durch DFO komplexiertes Zirkonium-89 wird, ohne Aufnahme in die Organe, mit einer biologischen Halbwertszeit von ca. fünf Minuten sehr schnell über die Nieren ausgeschieden (Abou et al. 2011, Holland et al. 2010). Jedoch umschließt DFO (hexadentat) ^{89}Zr nicht komplett, da es die Bindung nur über sechs der acht möglichen Koordinationspunkte des Zirkoniums gewährt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass sich das $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ion leicht durch ein Fe^{3+} -Ion verdrängen lässt (Deri et al. 2014). Aus diesen Gründen könnten $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ionen freigesetzt werden, die von Plasma-proteinen aufgenommen (Mealey 1957) und vornehmlich im Knochengewebe eingelagert werden (Fischer et al. 2013, Abou et al. 2011). Außerdem können $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ionen Verbindungen mit Phosphat eingehen (Osanai et al. 1989, Ghosh und Talukder 1992), die sich stark in Leber und Milz ablagern (Abou et al. 2011). Die gebildeten unlöslichen Zirkoniumphosphatsalze ($\text{ZrO}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; Löslichkeit $2,5 \times 10^{-4}$ g/l) können nur sehr langsam über das hepatobiliäre System ausgeschieden werden (Lee et al.

2010) und verbleiben dadurch vermutlich über einen längeren Zeitraum am Ort der Ablagerung (Abou et al. 2011). Auf diese Weise wären unerwartete Amyloidose-unabhängige radioaktive Signale in den PET/CT-Messungen und bei der anschließenden Autoradiographie der Organschnitte zu erklären (Abb. 39 und 40). Außerdem könnte es eine Erklärung für die Signalzunahme bei den PET/CT- und Radioaktivitätsuntersuchungen in den Organen zum Zeitpunkt 48 Stunde p.i. in allen untersuchten Tieren sein (Abb. 38 und 39). Die Dekomplexierung des Zirkoniums und die anschließende Bildung der Zirkoniumphosphatsalze laufen möglicherweise langsam ab, wodurch die gebildeten Salze über die Zeit in den Organen akkumuliert. Auf diese Weise würde zu dem Signal, welches aufgrund der Bindung von B10B10 an Amyloidfibrillen beobachtet wird, ein weiteres, in allen mit B10B10-DFO- ^{89}Zr injizierten Mäusen, hinzukommen. Bei der Bewertung der Bindung von B10B10 in den Mäusen müsste demnach eine Differenz aus dem Signal der mit Amyloid-belasteten Tiere und dem der PBS-Tiere gebildet werden. Neuartige Chelate, die nicht hexadentat, sondern octadentat sind (Guerard et al. 2013, Bhatt et al. 2017, Boros et al. 2016), wie z.B. HOPO (Deri et al. 2014 und 2015) und Tetraazamacrocyclische Liganden (DOTA, DOTAM, DOTAP; Pandya et al. 2017), könnten die Ausbildung von Zirkoniumsalzen durch die bessere Komplexierung des $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ions verhindern.

Weiterhin spricht der Versuchsansatz mit Iod-125-markiertem B10B10, bei dem weder Chelatoren noch Zirkonium eingesetzt wurden, für die oben beschriebene Theorie der präzipitierten Zirkoniumphosphatsalze in Milz und Leber. In diesem Experiment konnte, wie erwartet, eine Abnahme der radioaktiven Messsignale im SPECT über die Zeit in den mit AA-Amyloidose-belasteten Tieren beobachtet werden. Für den Einsatz des B10B10 im SPECT wurde dieser über eine Tyrosinseitenkette mithilfe von Chloramin-T iodiert. Dabei handelt es sich um eine kovalente Bindung des Iod-125 an den VHH-Antikörper. Der fehlende bzw. geringe Nachweis des Antikörpers durch SPECT/CT und Autoradiographie 24 und 48 Stunden p.i. könnte zwei Ursachen haben. Zum einen der schnelle Abbau des Antikörpers und dessen Ausscheidung. Zum anderen könnte es zu einer Dehalogenierung des gebundenen B10B10 kommen, was ebenfalls einen Signalverlust zur Folge hätte. Bereits vier Stunden p.i. konnten im SPECT/CT starke Signale in Schilddrüse und Magen der Tiere beobachtet werden (Abb. 43), was mit Dehalogenierungsprozessen in Zusammenhang gebracht wird (Wall et al. 2015). Jedoch spricht der sehr schnelle Signalverlust, laut der Einschätzung von Dr. S. Kennel aus der AG von Prof. J. Wall, gegen die Annahme, dass gebundenes B10B10 dehalogeniert wird. Zusätzlich sind laut Martin et al. (2014) Amyloid-assoziierte mit Iod-125 markierte Peptide, im Gegensatz zu nicht-gebundenen Peptiden, eher nicht von Dehalogenierungsprozessen betroffen. Möglicherweise sind auf diese Weise ebenso die hohen radioaktiven Messsignale in den PBS-Tieren in den Versuchen mit Zirkonium-89 zu erklären. Nicht gebundenes B10B10- ^{89}Zr würde schneller metabolisiert werden. Freie $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ionen würden mit Phosphat-Ionen reagieren und die oben genannten Salze in Milz und Leber bilden. Die Erhöhung aller radioaktiven Messsignale zum Zeitpunkt 48 Stunden p.i. könnte

ebenfalls auf Abbauprozesse des Antikörpers und damit verbundene Freisetzung von $^{89}\text{Zr}^{4+}$ -Ionen zurückzuführen sein, da, wie im SPECT/CT-Experiment mit B10B10- ^{125}I zu sehen war, anfangs gebundener Antikörper nach 48 Stunden ausgeschieden wurden.

Bei der histologischen Untersuchung v.a. der Leber und Milz nach den PET/CT-Messungen mit B10B10-DFO- ^{89}Zr fielen in den PBS-Tieren kleine gleichmäßig verteilte Silbersalzablagerungen auf. In den Tieren mit induzierter AA-Amyloidose waren zusätzlich deutliche schwarze Ablagerungen im Bereich der Marginalzone in der Milz und um den Glisson-Trias und die Zentralvene in der Leber zu erkennen. Dabei handelt es sich um Kongorot-positive Bereiche, in denen Amyloidfibrillen nachgewiesen wurden. Die ubiquitäre und unspezifische Ausbildung von Silbersalzen in den PBS-Tieren könnte durch die oben beschriebene Ausbildung von Zirkoniumphosphatsalzen (Osanaï et al. 1989, Ghosh und Talukder 1992, Abou et al. 2011) erklärt werden. Der Abbau von B10B10 könnte ebenfalls die beobachteten Silbersalze im Gewebe von PBS-Tieren erklären. Die Funktion der Milz besteht u.a. in der Entfernung von makromolekularen Antigenen aus dem Blut des Organismus. Auf diese Weise könnten nicht gebundene B10B10-Antikörper durch die Milz entfernt und über die Leber exkretiert werden. Zirkonium-markierte B10-Abbauprodukte wären daraufhin in diesen Organen nachweisbar. Jedoch ist die ubiquitäre Ausbildung der Silbersalze in der Autoradiographie zu allen Zeitpunkten gleichbleibend. Die durch das PET/CT und die direkte Vermessung der Organe ermittelte Radioaktivität hingegen nimmt über den Beobachtungszeitraum v.a. in den PBS-Tieren zu. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine methoden-spezifische Abweichung. Das Experiment mit ^{125}I -B10B10 kann dabei zu keinen weiteren Erkenntnissen beitragen, da hier die Dehalogenierung wie oben beschrieben zum Signalverlust führen kann, aber auch der Abbau des gesamten Antikörpers möglich ist. Ein Maß für die Eliminierungsgeschwindigkeit des Antikörpers aus dem Blut des Organismus ist die Bestimmung der Serumhalbwertszeit. Diese wurde in allen drei durchgeführten Experimenten für B10B10 mit durchschnittlich 46 Minuten ermittelt. Damit lag die Serumhalbwertszeit für B10B10 genau im Bereich der publizierten Daten von 36 Minuten (Hutt et al. 2012) und 54 Minuten (Coppeters et al. 2006) für die mit B10B10 vergleichbaren scFv-Antikörper. Außerdem war B10B10 länger im Blut nachweisbar, als B10 mit einer Serumhalbwertszeit von 17 Minuten. Eine Verlängerung der Halbwertszeit von B10B10 wäre z.B. durch Vergrößerung des hydrodynamischen Radius‘ eines Proteins, z.B. mit Hilfe von PEG oder durch Kopplung an eine länger zirkulierende Plasma-protein (z.B. Fc von IgG oder Serumalbumin (Coppeters et al. 2006)) und auch nicht-kovalent (Hutt et al. 2012) möglich. Dazu könnten die neuentwickelten B10-Formate (s. Abschnitt 1.6 und 4.1) weiterentwickelt und für zukünftige Bildgebungsmethoden eingesetzt werden.

Grundsätzlich wird die bildgebende Methode zur Detektion der AA-Amyloidose in der Maus auf Grundlage des VHH-Antikörpers B10B10 als geeignet eingestuft. Eine spezifische Detektion einer

ausgeprägten AA-Amyloidose ist, aufgrund der Serumhalbwertszeit von B10B10 (ca. 46 min), zwei bis vier Stunden nach der Injektion des radioaktiv markierten Antikörpers möglich und entspricht damit dem PET/CT-Messzeitraum. Zu späteren Zeitpunkten sind falsch-positive Interpretationen zur Bindungen von Amyloidfibrillen durch den Abbau des Antikörpers und die Bildung von Zirkonium-phosphatsalzen möglich.

4.4 Ausblick

Amyloid-bindende Proteine sind eine Grundlage für die Entwicklung eines nicht-invasiven Bildgebungsverfahrens zur Detektion einer systemischen AA-Amyloidose. Dabei ist eine hohe Diversität (z.B. Größe, Bispezifität) dieser Binder von Vorteil, da man auf diese Weise verschiedene Fragestellungen, z.B. abhängig von Gewebegängigkeit und Serumhalbwertszeit, bearbeiten kann.

In dieser Arbeit wurden fünf neuartige auf der VHH-Domäne B10 basierende Antikörperformate mit unterschiedlichen Eigenschaften und daraus entstehenden Vor- und Nachteilen für die Bildgebung von einer systemischen AA-Amyloidose entwickelt. Beispielsweise unterscheidet sich die Größe der Formate stark voneinander, was einen Einfluss auf die Gewebegängigkeit, Serumhalbwertszeit und folglich auf die Immunogenität der Antikörper hat.

Bei der Untersuchung der Immunogenität wurde eine größenabhängige Erhöhung der Konzentration von IgG-Antikörper gegen die B10-Formate (*anti-drug antibodies*, ADA) nachgewiesen. Im Fall von B10AP konnte gezeigt werden, dass diese anti-B10AP-IgG-Antikörper keine neutralisierende Wirkung auf die Bindung von B10AP an Amyloidfibrillen haben. Für die anderen B10-Formate muss diese Untersuchung noch durchgeführt werden. Weiterführende spezifische Tests, die von der FDA und der EMA zur Untersuchung von therapeutischen Proteinen in klinischen Studien verlangt werden, stehen noch aus.

Weiterhin ist die Methode zum Nachweis der ADA stark von der Nachweismethode abhängig (Pineda et al. 2016). Durch einen „Capture“-ELISA ist ein selektiver und spezifischer Nachweis von ADA möglich (Wadhwa et al. 2015). Dabei binden ADA das immobilisierte Protein und diese Bindung wird durch eine konjugierte Variante des Proteins detektiert. Die Voraussetzung ist die Herstellung fluoreszenz-, radioaktiv- oder enzymatisch-markierter B10-Antikörper.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Qualität der Bildgebung stark von der Markierung des Detektionsagens abhängig. Bei einer radioaktiven Markierung des Antikörpers über einen Metallchelate-Komplex wurde die Ausbildung von Zirkoniumphosphat-Salzen vermutet. Ein histologischer Nachweis dieses Salzes könnte durch die Von-Kossa-Färbung erbracht werden. Die Färbung dient ursprünglich dem indirekten Nachweis von Kalzium. Dabei ersetzen Silberionen das Kalziumion der

Kalziumphosphat- und Kalziumcarbonatsalze und werden anschließend durch Sonnenlicht zu elementarem Silber reduziert. Das Silber ist als schwarze Ablagerung im Gewebe zu erkennen. Da es sich um einen indirekten Nachweis von Kalzium handelt, soll diese Färbemethode zum Nachweis von Zirkoniumphosphatsalzen eingesetzt werden. In Milz und Leber, wo Zirkoniumsalze nachgewiesen werden sollen, sind keine Kalziumphosphate zu erwarten.

Nach einem positiven Nachweis der Zirkoniumphosphat-Salze könnte die Methode zur radioaktiven Markierung der B10-Antikörper abgeändert werden. Entweder man ersetzt den hexadentaten Chelator Desferrioxamin durch einen octadentaten Chelator, z.B. HOPO (Deri et al. 2014 und 2015) oder Tetraazamacrocyclische Liganden (DOTA, DOTAM, DOTAP; Pandya et al. 2017), oder man markiert die im PET/CT eingesetzten Proteine, wie in dieser Arbeit gezeigt, direkt durch Iodierung der Tyrosin-Seitenketten.

Wie in dieser Arbeit dargestellt wurde, ist die Bildgebung einer systemischen AA-Amyloidose mittels B10B10 im PET/CT möglich. Es wurden weitere verschiedene Amyloidbinder präsentiert, die grundsätzlich ebenfalls, nach einigen Vortests, in der Bildgebung getestet werden können. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Möglichkeiten zur radioaktiven Markierung der B10-Antikörper dargestellt. Für die zukünftige Weiterentwicklung und Anwendung des Modells ergeben sich auf diese Weise verschiedene Ansätze, die je nach Fragestellung erprobt werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine systemische AA-Amyloidose zeichnet sich durch fibrilläre Ablagerungen bestehend aus C-terminal verkürztem Serum Amyloid A (SAA) in Leber, Milz und anderen Organen nach einer langjährigen zugrunde liegenden Entzündungserkrankung aus. Die Entwicklung einer nicht-invasiven Methode zur frühzeitigen Detektion einer systemischen Amyloidose ist ein seit mehreren Jahren andauernder Prozess. Dabei sind bereits erfolgreich eingesetzte Amyloidbinder, wie SAP, u.a. in den USA nicht zugelassen wurden oder aufwendig in ihrer Herstellung und Gewinnung. Der rekombinant hergestellte B10 ist ein gut charakterisierter konformations-spezifischer VHH-Antikörper für die Erkennung von Amyloidfibrillen. Zusätzlich entwickelten Habicht et al. (2007) den bivalenten Antikörper B10AP mit einer erhöhten Bindungsaffinität.

In dieser Arbeit wurde jedoch eine starke IgG-basierte Immunantwort auf B10AP in NMRI Mäusen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden neuartige B10-basierte VHH-Antikörper rekombinant durch Hochzelldichte-Fermentation hergestellt, die die Vorteile des monovalenten B10 und des bivalenten B10AP kombinieren und das Eigenschaftsspektrum der B10-Antikörper erweitern. Durch direkte Verbindung zweier VHH-Domänen über einen Linker oder Kopplung einer VHH-Domäne an eine Doppelhelix, die mit einer zweiten gekoppelten Domäne dimerisieren kann, wurden beispielsweise neue bivalente B10-Antikörper generiert, die deutlich kleiner sind und auf die alkalische Phosphatase aus *E. coli* verzichten. Trotzdem wiesen diese Antikörper im SPR-Experiment eine mit B10AP vergleichbare Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich auf. Vor allem der bivalente B10B10 zeichnete sich zusätzlich durch eine mit B10 vergleichbare geringe Immunogenität in Mäusen aus. Aus diesem Grund wurde B10B10 *in situ* als Amyloidbinder in NMRI Mäusen mit einer durch Silbernitrat induzierten systemischen Amyloidose und in transgenen mit Amyloid belasteten huIL6-Mäusen getestet. Dazu wurde B10B10 über den Chelator Desferrioxamin mit Zr-89 für PET/CT bzw. direkt über eine Tyrosinseitenkette mit I-125 für SPECT/CT radioaktiv markiert. In beiden Mausmodellen wurde eine spezifische Amyloidbindung in Leber und Milz innerhalb von vier Stunden mittels Mikro-Autoradiographie histologisch nachgewiesen. Eine in allen Tieren beobachtete Zunahme der Radioaktivität 24 h und 48 h p.i. bei der Verwendung des mit Zr-89 markierten B10B10 ist möglicherweise auf die Ausbildung von Zirkoniumphosphat-Salzen zurückzuführen, da dieses Phänomen bei der Verwendung von mit I-125 halogeniertem B10B10 nicht beobachtet wurde. Eine genaue Untersuchung der Ausbildung dieser Salze muss zukünftig durchgeführt werden. Jedoch wurde mithilfe zweier methodisch verschiedener Bildgebungsverfahren gezeigt, dass B10B10 das Potential eines neuen Agens in der Diagnose von systemischen AA-Amyloidosen hat.

6. SUMMARY

Systemic AA Amyloidosis is characterized by fibril deposits consisting of C-terminal truncated serum amyloid A protein (SAA) in liver, spleen and other organs based on a chronic inflammatory disease. Development of a non-invasive method to detect the early onset of a systemic amyloidosis is an ongoing process for many years. However, already successfully tested amyloid binders are not approved by the FDA in the USA or expensive to produce. The recombinant VHH antibody B10 is a well characterized conformation-specific binder of amyloid fibrils. Furthermore, Habicht et al. (2007) developed the bivalent antibody B10AP with improved binding affinities.

In this study, we examined the immunogenicity of B10AP with a huge positive response in NMRI mice. For this purpose, we biotechnologically generated novel B10-based antibodies by high cell density fermentation. These novel B10 antibodies combine the advantages of monovalent B10 and bivalent B10AP to extend the range of properties of B10 antibodies. Through direct linking two VHH domains or link a VHH domain to a duple helical structure which can dimerize, it was possible to generate novel bivalent B10 antibodies of smaller size and without the *E. coli* alkaline phosphatase. Nevertheless, the antibodies had binding affinities comparable to B10AP, as it could be demonstrated by SPR. Additionally, bivalent B10B10 caused a low immune response in mice comparable to B10. Therefore, we tested the *in situ* binding ability of B10B10 to amyloid fibrils in amyloid-induced NMRI mice using desferrioxamine and Zr-89 labeled B10B10 in PET/CT and in transgenic huIL6 mice using directly via tyrosine I-125 labeled B10B10 in SPECT/CT. In both mouse models, we observed specific amyloid binding histologically verified by micro-autoradiography in liver and spleen within four hours. An increase of radioactivity in all animals 24 h and 48 h p.i. using Zr-89 labeled B10B10 was potentially due to formation of Zirconium phosphates salt cause this phenomenon was not observed using I-125 labeled B10B10. An exact validation of the salt forming process has to be observed in the upcoming experiments. However, these data demonstrate the potential of B10B10 as a novel agent in diagnosis of systemic AA Amyloidosis by two methodical different imaging systems.

7. REFERENZEN

- Abou, D. S., Ku, T., Smith-Jones, P. M. (2011) In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nucl Med Biol*, 38, 675-681.
- Ali-Khan, Z., Jothy, S., Al-Karmi, T. (1983) Murine alveolar hydatidosis: a potential experimental model for the study of AA-amyloidosis. *Br J Exp Pathol.*, 64, 599-611.
- Ali-Khan, Z., Li, W., Chan, S.L. (1996) Animal model for the pathogenesis of reactive amyloidosis. *Parasitol Today*, 12, 297-302.
- Axelrad, M.A., Kisilevsky, R., Willmer, J., Chen, S.J., Skinner, M. (1982) Further characterization of amyloid-enhancing factor. *Lab Invest.*, 47, 139-146.
- Baker, M.P., Reynolds, H.M., Lumicisi, B., Bryson, C.J. (2010) Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself*, 314-322.
- Berstein, L.R. (1998) Mechanisms of Therapeutic Activity for Gallium. *Pharmacological Reviews*, 50, 665-682.
- Bhatt, N.B., Pandaya, D.N., Xu, J., Tatum, D., Magda, D., Wadas, T.J. (2017) Evaluation of macrocyclic hydroxyisophthalamide ligands as chelators for zirconium-89. *PLoS ONE*, 12, e0178767.
- Blank, N., Hegenbart, U., Lohse, P., Beimler, J., Röcken, C., Ho, A.D., Lorenz, H.-M., Schönland, S.O. (2015) Risk factors for AA amyloidosis in Germany. *Amyloid*, 22, 1-7.
- Boll, H., Nittka, S., Doyon, F., Neumaier, M., Marx, A., Kramer, M., Groden, C., Brockmann, M.A. (2011) Micro-CT based experimental liver imaging using a nanoparticulate contrast agent: a longitudinal study in mice. *PLoS One*, 6, e25692.
- Boros, E., Holland, J.P., Kenton, N., Rotile, N., Caravan, P. (2016) Macrocyclic-Based Hydroxamate Ligands for Complexation and Immunoconjugation of ^{89}Zr for Positron Emission Tomography (PET) Imaging. *Chempluschem.*, 81, 274-281.
- Boyle, C. C., Paine, A. J., Mather, S. J. (1992) The mechanism of hepatic uptake of a radiolabelled monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 50, 912-917.
- Calis, J.J.A., Maybeno, M., Greenbaum, J.A., Weiskopf, D., De Silva, A.D., Sette, A., Kesmir, C., Peters, B. (2013) Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comp. Biol.* 9 (10), e1003266.
- Chapman, A.P., Antoniow, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S., King, D.J. (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol.*, 17, 780-783.
- Chiti, F., Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.*, 75, 333-366.
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., Van de Wiele, C., Staelens, L., Hostens, J., Revets, H., Remaut, E., Elewaut, D., Rottiers, P. (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 54, 1856-1866.
- Cytawa, W., Teodorczyk, J., Lass, P. (2014) Nuclear imaging of amyloidosis. *Pol J Radiol.*, 79, 222-227.
- Dember, L.M., Hawkins, P.N., Hazenberg, B.P., Gorevic, P.D., Merlini, G., Butrimiene, I., Livneh, A., Lesnyak, O., Puechal, X., Lachmann, H.J., Obici, L., Balshaw, R., Garceau, D., Hauck, W., Skinner, M., Eprodisate for, A. A. Amyloidosis Trial Group (2007) Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *N Engl J Med.*, 356, 2349-2360.
- Dennis, M.S., Zhang, M., Meng, Y.G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D., Damico, L.A. (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem.*, 277, 35035-35043.
- Deri, M.A., Ponnala, S., Kozlowski, P., Burton-Pye, B.P., Cicek, H.T., Hu, C., Lewis, J.S., Francesconi, L.C. (2015) p-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for (^{89}Zr) ImmunoPET. *Bioconjug Chem.*, 26, 2579-2591.

- Deri, M.A., Ponnala, S., Zeglis, B.M., Pohl, G., Dannenberg, J.J., Lewis, J.S., Francesconi, L.C. (2014) Alternative chelator for (89)Zr radiopharmaceuticals: radiolabeling and evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J Med Chem.*, 57, 4849-4860.
- Deri, M.A., Zeglis, B.M., Francesconi, L.C., Lewis, J.S. (2013) PET imaging with (89)Zr: from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol.*, 40, 3-14.
- Deryugina, EI., Quigley, JP. (2008) Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol*, 130, 1119–1130.
- Eisenberg, D., Wilcox, W., Eshita, S.M., Pryciak, P.M., Ho, S.P., DeGrado, W.F. (1986) The design, synthesis, and crystallization of an alpha-helical peptide. *Proteins*, 1, 16-22.
- Elsadek, B., Kratz, F. (2012) Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release*, 157, 4-28.
- Fischer, G., Seibold, U., Schirrmacher, R., Wangler, B., Wangler, C. (2013) (89)Zr, a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges. *Molecules*, 18, 6469-6490.
- Foster, J.S., Williams, A.D., Macy, S., Richey, T., Stuckey, A., Wooliver, D.C., Koul-Tiwari, R., Martin, E.B., Kennel, S.J., Wall, J.S. (2017) A Peptide-Fc Opsonin with Pan-Amyloid Reactivity. *Front Immunol.*, 8, 1082.
- Frame, N.M., Gursky, O. (2016) Structure of serum amyloid A suggests a mechanism for selective lipoprotein binding and functions: SAA as a hub in macromolecular interaction networks. *FEBS Letters*, 590, 866-879.
- Ganowiak, K., Hultman, P., Engstrom, U., Gustavsson, A., Westermark, P. (1994) Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 199, 306-312.
- Gellermann, G.P., Appel, T.R., Tannert, A., Radestock, A., Hortschansky, P., Schroeckh, V., Leisner, C., Lütkepohl, T., Shtrasburg, S., Röcken, C., Pras, M., Linke, R.P., Diekmann, S., Fändrich, M. (2005) Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *PNAS*, 102, 6297-6302.
- Ghosh, S.S.A., Talukder, G. (1992) Zirconium An Abnormal Trace Element in Biology. *Biological Trace Element Research*, 35, 247-271.
- Gill S.C., von Hippel P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.*, 182 (2), 319-26.
- Glaudemans, A.W.J.M., Slart, R.H.J.A., Noordzij, W., Dierckx, R.A.J.O., Hazenberg, B.P.C. (2013) Utility of ¹⁸F-FDG PET/(CT) in patients with systemic and localized amyloidosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40, 1095-1101.
- Glojnaric, I., Cuzic, S., Erakovic-Haber, V., Parnham, M.J. (2007) The serum amyloid A response to sterile silver nitrate in mice and its inhibition by dexamethasone and macrolide antibiotics. *Int Immunopharmacol.*, 7, 1544-1551.
- Goldsbury, C.S., Wirtz, S., Müller, S.A., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U., Frey, P. (2000) Studies on the in Vitro Assembly of Aβ 1–40: Implications for the Search for Aβ Fibril Formation Inhibitors. *J Struct Biol*, 130, 217-231.
- Gruys, E., Snel, F. W. (1994) Animal models for reactive amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol.*, 8, 599-611.
- Guerard, F., Lee, Y.S., Tripier, R., Szajek, L.P., Deschamps, J.R., Brechbiel, M.W. (2013) Investigation of Zr(IV) and 89Zr(IV) complexation with hydroxamates: progress towards designing a better chelator than desferrioxamine B for immuno-PET imaging. *Chem Commun. (Camb)*, 49, 1002-1004.
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K., Gellermann, G.P., Brodhun, M., Götz, J., Halbhuber, K.J., Röcken, C., Horn, U., Fändrich, M. (2007) Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Aβ protofibrils. *PNAS*, 104, 19232-19237.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363 (6428), 446-448.

- Harper, J.D., Lansbury, P.T. Jr. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem.*, 66, 385-407.
- Haupt, C., Bereza, M., Kumar, S.T., Kieninger, B., Morgado, I., Hortschansky, P., Fritz, G., Röcken, C., Horn, U., Fändrich, M. (2011a) Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils. *J Mol Biol.*, 408, 529-540.
- Haupt, C., Fändrich, M. (2014) Biotechnologically engineered protein binders for applications in amyloid diseases. *Trends Biotechnol.*, 32, 513-520.
- Haupt, C., Morgado, I., Kumar, S.T., Parthier, C., Bereza, M., Hortschansky, P., Stubbs, M.T., Horn, U., Fändrich, M. (2011b) Amyloid fibril recognition with the conformational B10 antibody fragment depends on electrostatic interactions. *J Mol Biol.*, 405, 341-348.
- Hawkins, P.N. (2002) Serum amyloid P component scintigraphy for diagnosis and monitoring amyloidosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11, 649-655.
- Hawkins, P.N., Myers, M.J., Epenetos, A.A., Caspi, D., Pepys, M.B. (1988) Specific localization and imaging of amyloid deposits in vivo using 123I-labeled serum amyloid P component. *J Exp Med.*, 167, 903-913.
- Hawkins, P.N., Lavender, J. P., Pepys, M.B. (1990) Evaluation of systemic amyloidosis by scintigraphy with 123I-labeled serum amyloid P component. *N Engl J Med*, 323, 508-513.
- Hawkins, P.N., Pepys, M.B. (1995) Imaging amyloidosis with radiolabelled SAP. *Eur J Nucl Med.*, 22, 595-599.
- Hayhurst, A., Harris, W. J. (1999) Escherichia coli skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr Purif.* 15 (3), 336 – 43.
- Hazenberg, B.P., van Rijswijk, M. H. (2000) Where has secondary amyloid gone? *Ann Rheum Dis.*, 59, 577-579.
- Hazenberg, B.P., van Rijswijk, M.H., Piers, D.A., Lub-de Hooge, M.N., Vellenga, E., Haagsma, E.B., Hawkins, P.N., Jager, P.L. (2006) Diagnostic performance of 123I-labeled serum amyloid P component scintigraphy in patients with amyloidosis. *Am J Med.*, 119, 355 e15-24.
- Holland, J.P., Divilov, V., Bander, N.H., Smith-Jones, P.M., Larson, S.M., Lewis, J.S. (2010) 89Zr-DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J Nucl Med.*, 51, 1293-1300.
- Holliger, P., Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotech.*, 23, 1126-1136.
- Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E, Hoet, R.M., Arends, J.-W., Roovers, R.C. (1998) *Immunotech.*, 4, 1-20.
- Husby, G., Marhaug, G., Dowton, B., Sletten, K., Sipe, J. D. (1994) Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid*, 1, 119-137.
- Hutt, M., Färber-Schwarz, A., Unverdorben, F., Richter, F., Kontermann, R.E. (2012) Plasma Half-life Extension of Small Recombinant Antibodies by Fusion to Immunoglobulin-binding Domains. *J Biol Chem.*, 287, 4462-4469.
- Ishihara, T. (1973) Experimental amyloidosis using silver nitrate-electron microscopic study on the relationship between silver granules, amyloid fibrils and reticuloendothelial system. *Acta Pathol Jpn.*, 23, 439-464.
- Janigan, D.T. (1965) Experimental Amyloidosis: Studies with a Modified Casein Method, Casein Hydrolysate and Gelatin. *Am J Pathol.*, 47, 159-171.
- Johan, K., Westermark, G., Engström, U., Gustavsson, A., Hultman, P., Westermark, P. (1998) Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95(5), 2558-2563.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., Xu, J. (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc.* 7 (8), 1511-22.
- Kapoor, V., McCook, B.M., Torok, F.S. (2004) An Introduction to PET-CT Imaging. *RadioGraphics*, 24, 523-543.
- Kennel, S. J., Williams, A., Stuckey, A., Richey, T., Wooliver, C., Chazin, W., Stern, D. A., Martin, E. B., Wall, J. S. (2016) The pattern recognition reagents RAGE VC1 and peptide p5 share

- common binding sites and exhibit specific reactivity with AA amyloid in mice. *Amyloid*, 23, 8-16.
- Kieninger, B., Gioeva, Z., Kruger, S., Westermarck, G.T., Friedrich, R.P., Fändrich, M., Röcken, C. (2011) PTAA and B10: new approaches to amyloid detection in tissue-evaluation of amyloid detection in tissue with a conjugated polyelectrolyte and a fibril-specific antibody fragment. *Amyloid*, 18, 47-52.
- Kim, S.J., Park, Y., Hong, H.J. (2005) Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*, 20(1), 17-29.
- Kisilevsky, R., Lemieux, L.J., Fraser, P.E., Kong, X., Hultin, P.G., Szarek, W.A. (1995) Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nat Med.*, 1, 143-148.
- Kisilevsky, R., Manley, P.N. (2012) Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid*, 1, 5-14.
- Kisilevsky, R., Young, I.D. (1994) Pathogenesis of amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol.*, 8, 613-626.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard, H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *PNAS*, 93, 10933-10938.
- Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G.F., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M.L., Barletta, J., Price, J.C., Sandell, J., Lopresti, B.J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C.A., Långström, B. (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.*, 55, 306-319.
- Kollmer, M., Meinhardt, K., Haupt, C., Liberta, F., Wulff, M., Linder, J., Handl, L., Heinrich, L., Loos, C., Schmidt, M., Syrovets, T., Simmet, T., Westermarck, P., Westermarck, G.T., Horn, U., Schmidt, V., Walther, P., Fändrich, M. (2016) Electron tomography reveals the fibril structure and lipid interactions in amyloid deposits. *PNAS*, 113, 5604-5609.
- Kovalchuk, A.L., Kim, J.S., Park, S.S., Coleman, A.E., Ward, J.M., Morse, H.C. 3rd, Kishimoto, T., Potter, M., Janz, S. (2002) IL6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 1509-1514.
- Kraft, M., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Kacholdt, A., Pietschmann, P., Hock, B., Horn, U. (2007) A dual expression platform to optimize the soluble production of heterologous proteins in the periplasm of Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 1413-1422.
- Kratz, F., Elsadek, B. (2012) Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*, 161, 429-445.
- Krishna, M., Nadler, S.G. (2016) Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-drug Immune Complexes. *Front Immunol.*, 7, 21.
- Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U., Pluckthun, A. (2006) PEGylation and multimerization of the anti-p185HER-2 single chain Fv fragment 4D5: effects on tumor targeting. *J Biol Chem.*, 281, 35186-35201.
- Lee, D.B., Roberts, M., Bluchel, C.G., Odell, R.A. (2010) Zirconium: biomedical and nephrological applications. *ASAIO J.*, 56, 550-556.
- Li, J.P., Galvis, M.L., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodavsky, I., Kisilevsky, R., Lindahl, U. (2005) In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *PNAS*, 102, 6473-6477.
- Lindahl, B., Lindahl, U. (1997) Amyloid-specific Heparan Sulfate from Human Liver and Spleen. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (42), 26091-26094.
- Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., Honegger, A., Klinger, B., Mocikat, R., Plückthun, A. (1997) Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *Biotechniques*, 22, 140-149.
- Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y., Sun, P. D. (2014) Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (14), 5189-5194.

- Lundmark, K., Westermark, G.T., Nyström, S., Murphy, C.L., Solomon, A., Westermark, P. (2002) Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10), 6979-6984.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsen, A., Westermark, P. (2005) Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *PNAS*. 102, 6098-6102.
- Ma J., Wang S., Zhao F., Xu J. (2013) Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics.*, 29 (13), i257-265.
- Malyala, P. & Singh, M. (2008) Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J. Pharm. Sci.* 97, 2041-2044.
- Manenti, L., Tansinda, P., Vaglio, A. (2008) Eprodinate in amyloid A amyloidosis: a novel therapeutic approach? *Expert Opin Pharmacother*, 9, 2175-2180.
- Martin, E.B., Kennel, S.J., Richey, T., Wooliver, C., Osborne, D., Williams, A., Stuckey, A., Wall, J.S. (2014) Dynamic PET and SPECT imaging with radioiodinated, amyloid-reactive peptide p5 in mice: a positive role for peptide dehalogenation. *Peptides*, 60, 63-70.
- Martin, E.B., Williams, A., Richey, T., Stuckey, A., Heidel, R.E., Kennel, S.J., Wall, J.S. (2016) Comparative evaluation of p5+14 with SAP and peptide p5 by dual-energy SPECT imaging of mice with AA amyloidosis. *Sci Rep.*, 6, 22695.
- Martin, E.B., Williams, A., Richey, T., Wooliver, C., Stuckey, A., Foster, J.S., Kennel, S.J., Wall, J.S. (2017) Evaluation of the effect of D-amino acid incorporation into amyloid-reactive peptides. *J Transl Med.*, 15, 247.
- Maurer, R., Meyer, B.J., Ptashne, M. (1980) Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage λ : I. OR3 and autogenous negative control by repressor. *J Mol Biol.*, 139, 147-161.
- Mealey, J. (1954) Turn-over of Carrier-Free Zirconium-89 in Man. *Nature*, 179, 673-674.
- Meijs, W.E., Haisma, H.J., Klok, R.P., vanGog, F.B., Kievit, E., Pinedo, H.M., Herscheid, J.D. (1997) Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 38, 112-118.
- Meijs, W.E., Herscheid, J.D.M., Haisma, H.J., Pinedo, H.M. (1992) Evaluation of Desferal as a Bifunctional Chelating Agent for Labeling Antibodies with Zr-89. *Appl. Radiat. Isot.* 43, 1443-1447.
- Mire-Sluis, A.R., Barrett, Y.C., Devanarayan, V., Koren, E., Liu, H., Maia, M., Parish, T., Scott, G., Shankar, G., Shores, E., Swanson, S.J., Taniguchi, G., Wierda, D., Zuckerman, L.A. (2004) Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*, 289, 1-16.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., Plückthun, A. (1998) A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity. *FEBS Lett*, 432, 45-49.
- Muyldermans, S. (2001) Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol.*, 277-302.
- Muyldermans, S. (2013) Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.*, 82, 775-797.
- Nguyen, A., Reyes, A.E., 2nd, Zhang, M., McDonald, P., Wong, W.L., Damico, L.A., Dennis, M.S. (2006) The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. *Protein Eng Des Sel.*, 19, 291-297.
- Ogata, A., Tanaka, T. (2012) Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic autoimmune diseases: current perspectives and future directions. *Int J Rheumatol.*, doi: 10.1155/2012/946048.
- Okuda, Y., Ohnishi, M., Matoba, K., Jouyama, K., Yamada, A., Sawada, N., Mokuda, S., Murata, Y., Takasugi, K. (2014) Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. *Mod. Rheumatol.*, 24, 137-143.
- Osanai, T., Hayakawa, K., Kikushi, N., Konno, S., Ito, K., Shibata, N., Suzuki, S. (1989) Investigation of Interference by Inorganic Phosphate on Coprecipitation of Cadmium, Copper, Manganese and Lead in Water with Zirconium Hydroxide. *Pharmaceutical Society of Japan*. 35, 297-300.

- Pack, P., Plückthun, A. (1992) Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31, 1579-1584.
- Pandya, D.N., Bhatt, N., Yuan, H., Day, C.S., Ehrmann, B.M., Wright, M., Bierbach, U., Wadas, T.J. (2017) Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development. *Chem Sci.*, 8, 2309-2314.
- Peng, J. und Xu, J. (2011b) RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins*, 79 (S10), 161-171.
- Peng, J. und Xu, J. (2011a) A multiple-template approach to protein threading. *Proteins*. 79 (6), 1930-1939.
- Pepys, M.B. (2006) Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.*, 57, 223-241.
- Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P., Hawkins, P.N. (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417, 254-259.
- Perk, L. R., Vosjan, M. J., Visser, G. W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G. E., van Dongen, G. A. (2010) p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37 (2), 250-259.
- Pettersson, T., Kontinen, Y.T., Maury, C.P. (2008) Treatment strategies for amyloid A amyloidosis. *Expert Opin Pharmacother.*, 9, 2117-2128.
- Pettersson, T., Kontinen, Y.T., Maury, C.P. (2008) Treatment strategies for amyloid A amyloidosis. *Expert Opin Pharmacother.*, 9, 2117-2128.
- Pineda, C., Castaneda Hernandez, G., Jacobs, I.A., Alvarez, D.F., Carini, C. (2016) Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs*, 30, 195-206.
- Plückthun, A. (2015) Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 55, 489-511.
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., Franklin, E.C. (1968) The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest.*, 47 (4), 924-933.
- Price, JB., Barry, MP., Andrews, IJ. (1986) The use of the chick chorioallantoic membrane to predict eye irritants. *Food Chem Toxicol*, 24, 503-505.
- Puchtler, H., Sweat, F., Levine, M. (1962) On the binding of Congo Red by amyloid. *J Histochem. Cytochem.* 10, 355-364.
- Ray, A., Kumar, D., Shakya, A., Brown, C.R., Cook, J.L., Ray, B.K. (2004) Serum amyloid A-activating factor-1 (SAF-1) transgenic mice are prone to develop a severe form of inflammation-induced arthritis. *J Immunol.*, 173, 4684-4691.
- Ray, A., Shakya, A., Kumar, D., Benson, M.D., Ray, B.K. (2006) Inflammation-responsive transcription factor SAF-1 activity is linked to the development of amyloid A amyloidosis. *J Immunol.*, 177, 2601-2609.
- Robinson, M.P., Ke, N., Lobstein, J., Peterson, C., Szkodny, A., Mansell, T.J., Tuckey, C., Riggs, P.D., Colussi, P.A., Noren, C.J., Taron, C.H., DeLisa, M.P., Berkmen, M. (2015) Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat Commun.*, 6, 8072.
- Röcken, C., Eriksson, M. (2009) Amyloid und Amyloidosen. *Pathologe*, 30, 182-192.
- Röcken, C., Menard, R., Bühling, F., Vöckler, S., Raynes, J., Stix, B., Krüger, S., Roessner, A., Kähne, T. (2005) Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 808-815.
- Röcken, C., Shakespeare, A. (2002) Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis. *Virchows Arch.*, 440, 111-122.

- Rohren, E.M., Turkington, T.G., Coleman, R.E. (2004) Clinical applications of PET in oncology. *Radiology*, 231, 305-332.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- Rumjon, A., Coats, T., Javaid, M.M. (2012) Review of eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *Int J Nephrol Renovasc Dis.*, 5, 37-43.
- Sahota, T., Berger, A., Barton, S., Cookson, L., Zamuner, S., Richards, D. (2015) Target Mediated Drug Disposition Model of CPHPC in Patients with Systemic Amyloidosis. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.*, 4, e15.
- Sands, H. & Jones, P. L. (1987) Methods for the study of the metabolism of radiolabeled monoclonal antibodies by liver and tumor. *J. Nucl. Med.*, 28, 390-398.
- Scheidt, H.A., Morgado, I., Rothmund, S., Huster, D., Fändrich, M. (2011) Solid-State NMR Spectroscopic Investigation of A β Protofibrils: Implication of a β -Sheet Remodeling upon Maturation into Terminal Amyloid Fibrils. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 2837-2840.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.*, 26, 489-501.
- Schlapschy, M., Dommel, M. K., Hadian, K., Fogarasi, M., Korndorfer, I. P., Skerra, A. (2004) The periplasmic *E. coli* chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization. *Biol Chem.* 385 (2), 137- 143.
- Seubert, P., Solomon, A., Schenk, D. (2011) Generation and characterization of anti-AA amyloid-specific monoclonal antibodies. *Front Immunol*, 2 (32), doi:10.3389/fimmu.2011.0003
- Shankar, G., Arkin, S., Cocea, L., Devanarayan, V., Kirshner, S., Kromminga, A., Quarmby, V., Richards, S., Schneider, C.K., Subramanyam, M., Swanson, S., Verthelyi, D., Yim, S., American Association of Pharmaceutical Scientists (2014) Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. *AAPS J.*, 16, 658-673.
- Sharma, U., Pal, D., Prasad, R. (2014) Alkaline Phosphatase: An Overview. *Ind J Clin Biochem.*, 29, 269-278.
- Simons, J. P., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., Speck, I., Aslam, S., Hutchinson, W.L., Mangione, P.P., Disterer, P., Gilbertson, J.A., Hunt, T., Millar, D.J., Minogue, S., Bodin, K., Pepys, M.B., Hawkins, P.N. (2013) Pathogenetic mechanisms of amyloid A amyloidosis. *PNAS*, 110, 16115-16120.
- Sipe, J. D., McAdam, K. P., Uchino, F. (1978) Biochemical evidence for the biphasic development of experimental amyloidosis. *Lab. Invest.*, 38, 110-114.
- Sipe, J. D. (1994) Amyloidosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 31, 325-354.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.-I., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., Westermark, P. (2016) Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, 23, 209-213.
- Skerra, A. (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr Opin Immunol.*, 5, 256-262.
- Skinner, M., Shirahama, T., Benson, M.D., Cohen, A.S. (1977) Murine amyloid protein AA in casein-induced experimental amyloidosis. *Lab Invest.*, 36, 420-427.
- Skinner, M., Shirahama, T., Cohen, A.S., Deal, C.L. (1982) The association of amyloid P-component (AP) with the amyloid fibril: an updated method for amyloid fibril protein isolation. *Prep Biochem.*, 12, 461-476.
- Smits, N.C., Lensen, J.F., Wijnhoven, T.J., Ten Dam, G.B., Jenniskens, G.J., van Kuppevelt, T.H. (2006) Phage display-derived human antibodies against specific glycosaminoglycan epitopes. *Methods Enzymol.*, 416, 61-87.
- Snow, A.D., Bramson, R., Mar, H., Wight, T.N., Kisilevsky, R. (1991) A temporal and ultrastructural relationship between heparan sulfate proteoglycans and AA amyloid in experimental amyloidosis. *J Histochem Cytochem.*, 39, 1321-1330.

- Snow, A.D., Kisilevsky, R., Stephens, C., and Anastassiades, T. (1987) Characterization of tissue and plasma glycosaminoglycans during experimental AA amyloidosis and acute inflammation. Quantitative and qualitative analysis, *Lab. Invest.*, 56, 665–675.
- Solomon, A., Weiss, D.T., Schell, M., Hrcic, R., Murphy, C.L., Wall, J., McGavin, M.D., Pan, H.J., Kabalka, G.W., Paulus, M.J. (1999) Transgenic mouse model of AA amyloidosis. *Am J Pathol.*, 154, 1267-1272.
- Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., Herwig, C. (2014) Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol.*, 32, 54-60.
- Steeland, S., Puimège, L., Vandenbroucke, R.E., Van Hauwermeiren, F., Haustraete, J., Devoogdt, N., Hulpiau, P., Leroux-Roels, G., Laukens, D., Meuleman, P., De Vos, M., Libert, C. (2015) Generation and characterization of small single domain antibodies inhibiting human tumor necrosis factor receptor 1. *J Biol Chem.*, 290 (7), 4022-4037.
- Stenstad, T., Magnus, J.H., Husby, G. (1994) Characterization of proteoglycans associated with mouse splenic AA amyloidosis. *Biochem J.*, 303, 663-670.
- Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Van Xong, H., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., De Baetselier, P., Muyldermans, S., Magez, S. (2004) Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem.*, 279, 1256-1261.
- Strohl, W.R. (2015) Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *BioDrugs*, 29, 215-239.
- Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., Kishimoto, T. (1992) Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *PNAS*, 89, 232-235.
- Teilum, G. (1964) Pathogenesis of amyloidosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 61, 21-45.
- van der Hilst, J.C. (2011) Recent insights into the pathogenesis of type AA amyloidosis. *Scientific World Journal*, 11, 641-650
- Vaneycken, I., D'Huyvetter, M., Hernot, S., De Vos, J., Xavier, C., Devoogdt, N., Caveliers, V., Lahoutte, T. (2011) Immuno-imaging using nanobodies. *Current Opinion in Biotechnology*. 22, 877-881.
- Vosjan, M.J., Perk, L.R., Visser, G.W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E., van Dongen, G.A. (2010) Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat. Protoc.* 5 (4), 739-743.
- Wadhwa, M., Knezevic, I., Kang, H.N., Thorpe, R. (2015) Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. *Biologicals*, 43, 298-306.
- Wall, J. S., Kennel, S. J., Richey, T., Allen, A., Stuckey, A., Weiss, D. T., Macy, S. D., Barbour, R. Seubert, P., Solomon, A., Schenk, D. (2011a) Generation and characterization of anti-AA amyloid-specific monoclonal antibodies. *Front Immunol.*, 2, 32.
- Wall, J.S., Kennel, S.J., Paulus, M., Gregor, J., Richey, T., Avenell, J., Yap, J., Townsend, D., Weiss, D. T., Solomon, A. (2006) Radioimaging of light chain amyloid with a fibril-reactive monoclonal antibody. *J Nucl Med*, 47, 2016-2024.
- Wall, J.S., Kennel, S.J., Paulus, M.J., Gleason, S., Gregor, J., Baba, J., Schell, M., Richey, T., O'Nuallain, B., Donnell, R., Hawkins, P.N., Weiss, D.T., Solomon, A. (2005) Quantitative high-resolution microradiographic imaging of amyloid deposits in a novel murine model of AA amyloidosis. *Amyloid*, 12, 149-156.
- Wall, J.S., Martin, E.B., Richey, T., Stuckey, A.C., Macy, S., Wooliver, C., Williams, A., Foster, J.S., McWilliams-Koeppen, P., Uberbacher, E., Cheng, X., Kennel, S. J. (2015) Preclinical Validation of the Heparin-Reactive Peptide p5+14 as a Molecular Imaging Agent for Visceral Amyloidosis. *Molecules*, 20, 7657-7682.
- Wall, J.S., Richey, T., Stuckey, A., Donnell, R., Macy, S., Martin, E. B., Williams, A., Higuchi, K., Kennel, S. J. (2011b) In vivo molecular imaging of peripheral amyloidosis using heparin-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108(34), 586-594.

- Wall, J.S., Richey, T., Stuckey, A., Donnell, R., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T.H., Smits, N.C., Kennel, S.J. (2012) SPECT imaging of peripheral amyloid in mice by targeting hyper-sulfated heparan sulfate proteoglycans with specific scFv antibodies. *Nucl Med Biol.*, 39, 65-75.
- Wall, J.S., Williams, A., Richey, T., Stuckey, A., Huang, Y., Wooliver, C., Macy, S., Heidel, E., Gupta, N., Lee, A., Rader, B., Martin, E. B., Kennel, S. J. (2013) A binding-site barrier affects imaging efficiency of high affinity amyloid-reactive Peptide radiotracers in vivo. *PLoS One*, 8, e66181.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol Chem.*, 272, 22364-22372.
- Walther, M., Gebhardt, P., Grosse-Gehling, P., Wurbach, L., Irmeler, I., Preusche, S., Khalid, M., Opfermann, T., Kamradt, T., Steinbach, J., Saluz, H.P. (2010) Implementation of ⁸⁹Zr production and in vivo imaging of B-cells in mice with ⁸⁹Zr-labeled anti-B-cell antibodies by small animal PET/CT. *Appl Radiat Isot.*, 69 (6), 852-857.
- Westermarck, G.T., Fändrich, M., Westermarck, P. (2015) AA Amyloidosis: Pathogenesis and Targeted Therapy. *Annu Rev Pathol*, 10, 321-344.
- Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S.-I., Masters C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J., Sipe, J. D. (2007) A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*, 14(3), 179-183.
- Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Rollence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E., Yokota, T., Schlom, J. (1993) An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.*, 6, 989-995.
- Willekens, I., Lahoutte, T., Buls, N., Vanhove, C., Deklerck, R., Bossuyt, A., de Mey, J. (2009) Time-course of contrast enhancement in spleen and liver with Exia 160, Fenestra LC, and VC. *Mol Imaging Biol.*, 11, 128-135.
- Willerson, J.T., Gordon, J.K., Talal, N., Barth, W.F. (1969) Murine amyloid. II. Transfer of an amyloid-accelerating substance. *Arthritis Rheum.*, 12, 232-240.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P. A., Zangemeister-Wittke, U., Plückthun, A. (2001) Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J Biol Chem.*, 276, 14385-14392.
- Würbach, L., Heidrich, A., Opfermann, T., Gebhardt, P., Saluz, H. (2012) Insights into bone metabolism of avian embryos in ovo via 3D and 4D [¹⁸F]-fluoride positron emission tomography. *Mol Imaging Biol.*, 14, 688-698.
- Yamada, T., Liepnieks, J.J., Kluve-Beckerman, B., Benson, M.D. (1995) Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand J Immunol.*, 41, 94-97.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Albuminbindendes Peptid
ADA	<i>anti drug antibodies</i>
ADCC	Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>)
AEF	<i>Amyloid Enhancing Factor</i>
AP	alkalische Phosphatase
A β	Amyloid β
bla	β -Lactamase
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität (<i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CDR	<i>complementary determining region</i>
CT	Computertomografie
dhlx	Doppelhelix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	fragment antigen binding
FBM	Feuchtbiomasse
FBS	<i>Fetal Bovin Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	<i>framework region</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GS	Glycin-Serin-Linker
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
i.v.	intravenös
IEC	Ionenaustauschchromatographie (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IMAC	Metallionen-Affinitäts-chromatographie (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

LDH	Lactatdehydrogenase
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indoxyphosphat
NC	Nitrozellulose
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-Nitrilotriacetic acid)
OD	optische Dichte
p.i.	nach der Injektion (<i>post injection</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS-Tween20
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
pI	isoelektrischer Punkt
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Skp	Chaparon (<i>seventeen kilo Dalton protein</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VHH	variable Domäne der Schwere-Ketten-Antikörper (<i>variable domain of heavy chain antibodies</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp
ZP	Zielprotein

9. ANHANG

Tabelle A1: Radioaktivität des B10B10-Df-Zr⁸⁹ vor und zum Zeitpunkt der Injektion in fünf AA-Amyloidose- belastete Mäuse (AA Maus) und zwei PBS-Kontrollmäuse. Zusätzlich wurde die spezifische Aktivität des Antikörpers im Blut der Tiere 2 h, 24 h, und 48 h nach Injektion gemessen. (Versuch C1)

		Injizierte Aktivität (MBq)	Spez. Aktivität Blut, 2 h (cps/µl)	Spez. Aktivität Blut, 24 h (cps/µl)	Spez. Aktivität Blut, 48 h (cps/µl)
AA-Amyloidose	Maus 1	4,211	1,78	0,54	0,86
	Maus 2	3,989	1,12	0,32	0,25
	Maus 3	4,177	5,56	0,45	0,48
	Maus 4	4,451	2,42	0,37	0,33
	Maus 5	4,262	4,18	0,35	0,26
PBS	Maus 1	4,186	2,28	0,26	0,20
	Maus 2	4,297	1,22	0,31	0,25

Tabelle A2: Verteilung der radioaktiv markierten Antikörper 24 Stunden nach Injektion.

Organe	Spezifische biologische Verteilung (%ID/g)					
	B10			B10B10		
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Muskel	0,09	0,09	0,16	0,06	0,49	0,08
Leber	0,34	0,39	0,47	1,56	1,04	1,78
Pankreas	0,28	0,28	0,35	0,66	1,56	0,47
Milz	0,23	0,32	0,37	1,21	0,77	1,66
Niere links	0,34	0,37	0,48	0,32	1,17	0,30
Niere rechts	0,32	0,42	0,42	0,37	1,13	0,36
Magen	1,41	1,24	2,65	1,44	11,19	1,73
Oberer Darm	0,27	0,24	0,41	0,29	0,69	0,25
Unterer Darm	0,20	0,18	0,24	0,25	0,67	0,17
Herz	0,13	0,11	0,17	0,20	0,55	0,22
Lunge	0,27	0,24	0,42	0,39	1,17	0,32
Blut	0,26	0,22	0,44	0,26	1,53	0,27

Tabelle A3: Verteilung der radioaktiv markierten Antikörper 48 Stunden nach Injektion.

Organe	Spezifische biologische Verteilung (%ID/g)					
	B10			B10B10		
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Muskel	0,01	0,03	0,01	0,03	0,15	0,02
Leber	0,04	0,09	0,07	0,44	0,87	0,38
Pankreas	0,02	0,03	0,03	0,29	0,57	0,56
Milz	0,04	0,06	0,06	0,28	0,81	0,40
Niere links	0,03	0,07	0,21	0,14	0,47	0,13
Niere rechts	0,03	0,13	0,05	0,17	0,50	0,13
Magen	0,05	0,17	0,12	0,82	3,14	0,91
Oberer Darm	0,04	0,03	0,02	0,10	0,37	0,11
Unterer Darm	0,02	0,03	0,03	0,07	0,31	0,10
Herz	0,01	0,02	0,02	0,08	0,27	0,06
Lunge	0,03	0,06	0,05	0,15	0,48	0,09
Blut	0,01	0,03	0,03	n.d.*	0,60	0,06

*nicht detektierbar

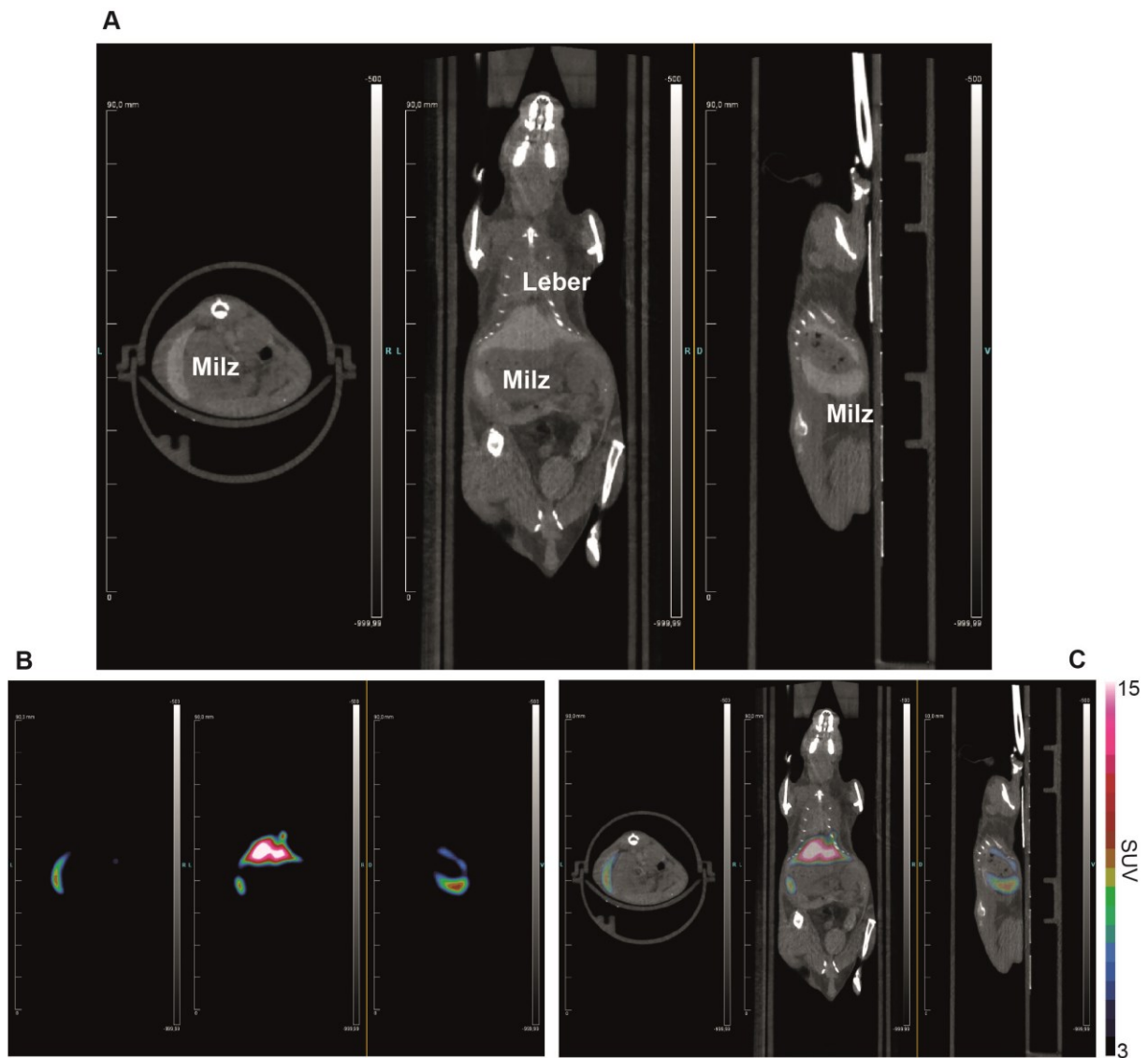


Abbildung A1: Darstellung vom CT (A), PET (B) und der Überlagerung beider Signale (C).

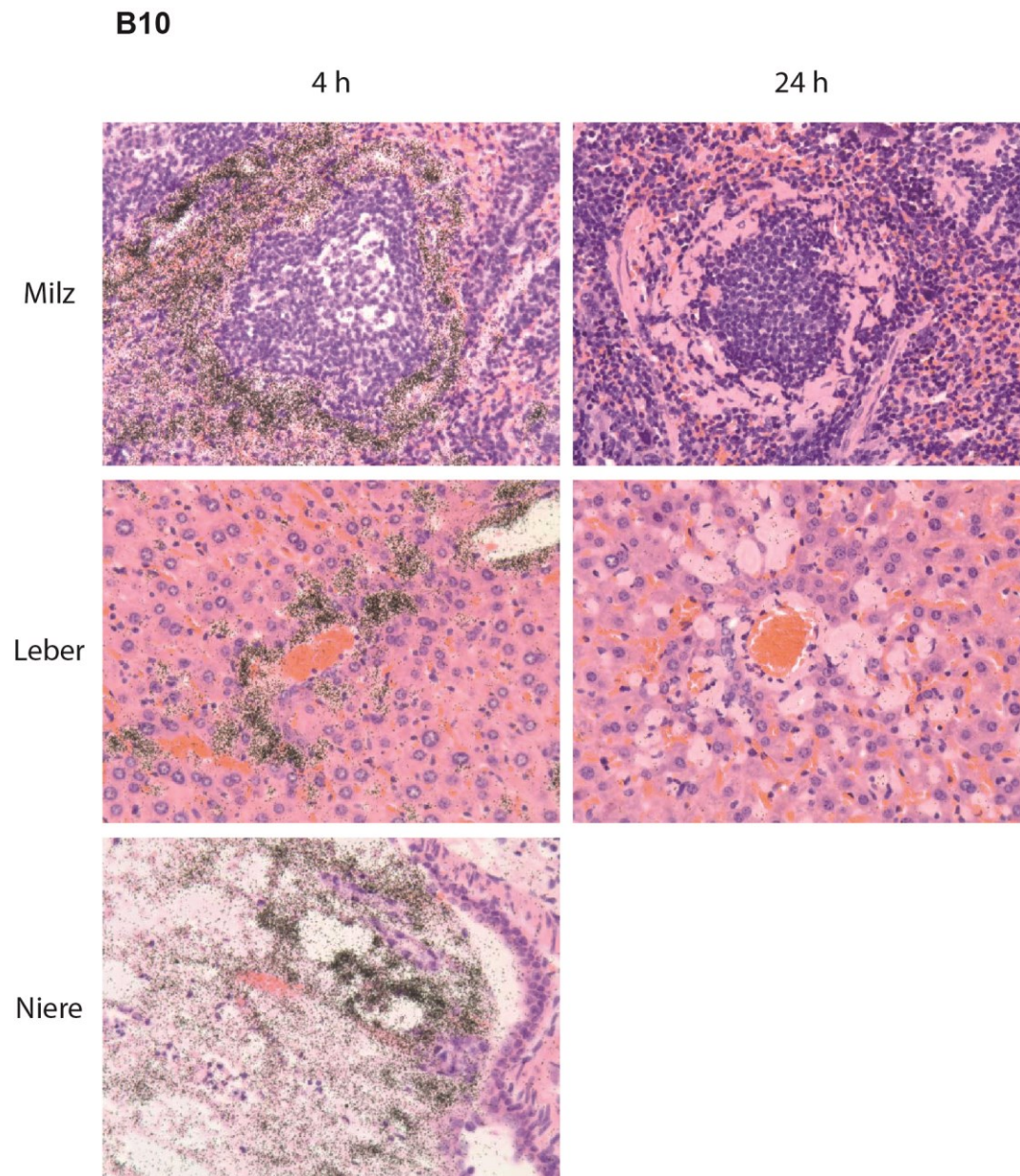


Abbildung A2: Autoradiographie von Leber, Milz und Niere transgener huIL6-Mäuse vier und 24 Stunden nach Injektion von ^{125}I -B10.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Verwirklichen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst gilt mein Dank meinem Betreuer Dr. Uwe Horn für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie Prof. Dr. Marcus Fändrich und Dr. Christian Haupt für die Zusammenarbeit bei der Planung des Projekts.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Peter Saluz für die Vertretung der Dissertation vor dem Fachbereich bedanken.

Ich bedanke mich weiterhin bei Dr. Hans-Martin Dahse für die Zusammenarbeit bei der Testung der Zelltoxizität und Dr. Peter Hortschansky bei den SPR-Untersuchungen, sowie Dirk Femerling und Uwe Knüpfer für die reichliche Unterstützung im Labor.

Im Zusammenhang mit den Tierversuchen danke ich Prof. Dr. Ilse Jacobsen, Dr. Maria Straßburger, Dr. Peter Gebhardt, Dr. Björn Gebser, Michel Pfeifer-Leeg, Bianca Hoffmann, Birgit Schikowski, sowie Katrin Buder und Maik Baldauf des Fritz-Lipmann-Instituts Jena. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. G. Westermarck vom Biomedicinskt centrum (BMC) Uppsala/Schweden für die Möglichkeit, in ihrer Forschungsgruppe, das Silbernitrat-induzierte AA-Amyloidose Mausmodell zu erlernen. Prof. J. S. Wall und seinem Team der University of Tennessee/USA danke ich für die interessante Kooperation zur Bildgebung der AA-Amyloidose.

Ich danke meinen Arbeitskollegen des Biotechnikums, die mir jederzeit gern mit ihrem Rat zur Seite standen und stets für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten. Vor allem meinen Mit-Doktoranden danke ich für die tolle Diskussionsbereitschaft und praktische Unterstützung im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinem Partner Jan, für die Ermutigung und den nötigen Rückhalt während der Bearbeitungszeit dieser Arbeit. Ich danke meiner Tochter Frida, dass sie auch nach einem langen Arbeitstag mit einem strahlenden Lächeln und ihrer Begeisterung für die alltäglich gewordenen Dinge für den nötigen Ausgleich sorgte.

11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, keine Textabschnitte Dritter ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen angegeben habe.

Weiterhin habe ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die vorliegende Dissertation oder wesentliche Teile nicht zuvor als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung oder als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht. Außerdem habe ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zur Erlangung des akademischen Grades „doctor rerum naturalium“ an einer anderen Hochschule beantragt.

Die Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, 25.10.2018

Liesa Heinrich